

Optimiranje procesa mikroinkapsulacije industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.)

Stažić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:169780>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni, 2019.godina

Ema Stažić

1104/PI

**OPTIMIRANJE PROCESA
MIKROINKAPSULACIJE
INDUSTRIJSKE KONOPLJE
(*Cannabis sativa* L.)**

Rad je izrađen u Kabinetu za osnove inženjerstva na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Maje Benković, te uz pomoć doc.dr.sc. Tamare Jurina iz Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju, Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Maji Benković na pomoći i savjetima prilikom izrade diplomskog rada. Također se zahvaljujem doc.dr.sc. Tamari Jurini i doc.dr.sc. Ani Jurinjak Tušek na pomoći prilikom izvedbe ovog rada. Zahvaljujem se svojoj obitelji, pogotovo roditeljima koji su mi bili velika podrška, kolegicama s faksa s kojima sam zajedno učila te prijateljima i dečku na punoj potpori tijekom pisanja ovog rada i tijekom čitavog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Kabinet za osnove inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIRANJE PROCESA MIKROINKAPSULACIJE INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)

Emma Stažić/1104 PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je definirati optimalne uvjete procesa mikroinkapsulacije vodenog ekstrakta industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) u skladu s parametrima koji utječu na kemijska i fizikalna svojstva mikrokapsula. Eksperimentalni dio rada proveden je prema Box-Behnken dizajnu eksperimenta s tri faktora na tri razine: koncentracija otopine alginata, koncentracija ekstrakta i koncentracija otopine CaCl_2 pri čemu je proizvedeno 17 uzoraka mikrokapsula. Na mikrokapsulama su provedene analize fizikalnih svojstava: veličina čestica, ukupne otopljene tvari (TDS) i vodljivost, čvrstoća, kompresibilnost te suha tvar i kemijskih svojstava: antioksidacijska aktivnost (DPPH i FRAP), udio ukupnih polifenola (TPC), učinkovitost mikroinkapsuliranja te oslobođena antioksidacijska aktivnost i oslobođen sadržaj ukupnih polifenola iz mikrokapsula. Temeljem statističke analize utvrđeno je da je koncentracija otopine alginata imala značajan utjecaj na veličinu mikrokapsula, sadržaj suhe tvari, sadržaj ukupnih polifenola, antioksidacijsku aktivnost, oslobađanje aktivnih tvari i učinkovitost mikroinkapsulacije, dok je koncentracija ekstrakta imala je značajan utjecaj na veličinu čestica, sadržaj ukupnih polifenola, antioksidacijsku aktivnost i oslobađanje aktivnih tvari. Optimiranjem su utvrđeni sljedeći optimalni uvjeti procesa: za fizikalna svojstva - postotak otopine alginata od 4 % (w/w), koncentracija ekstrakta 75 % (v/v) te postotak otopine CaCl_2 2,25 % (w/w), a za kemijska svojstva: otopina alginata koncentracije 3 % (w/w), koncentracija ekstrakta 75 % (v/v) i postotak otopine CaCl_2 2 % (w/w).

Ključne riječi: mikroinkapsulacija, industrijska konoplja, optimiranje, polifenoli, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 58 stranica, 22 slike, 11 tablica, 63 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Maja Benković

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Tamara Jurina

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek
2. Doc. dr. sc. Maja Benković
3. Izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević
4. Doc. dr. sc. Davor Valinger (zamjena)

Datum obrane: 29. studenog 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Section for fundamental engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF MICROENCAPSULATION OF INDUSTRIAL HEMP (*Cannabis sativa* *L. sativa*)

Ema Stažić/1104 PI

Abstract: The aim of this study was to define optimal conditions for microencapsulation of aqueous extract of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) according to the parameters that affect chemical and physical characteristics of microcapsules. The experimental part of the study was conducted by Box-Behnken design of experiment which included 3 factors on 3 levels: alginate solution concentration, extract concentration and concentration of CaCl₂ solution. 17 samples of microcapsules were produced and their physical properties were analyzed: particle size, total solvent, total dissolved solid (TDS), conductivity, firmness, compressibility and dry matter content. Chemical properties were analyzed as well: antioxidant activity (DPPH and FRAP), total polyphenols content (TPC), microencapsulation efficiency, antioxidant activity and total polyphenol content released from microcapsules. Statistical analysis showed that concentration of alginate solution had significant effect on particle size, dry matter content, TPC, antioxidant activity, release of active substances and microencapsulation efficiency. Extract concentration had a significant effect on the particle size and the TPC, antioxidant activity and release of active substances. The determined optimal conditions were: for physical properties - alginate solution of 4 % (w/w), extract concentration 75 % (v/v) and CaCl₂ solution of 2.25 % (w/w), and for chemical properties - alginate solution concentration 3 % (w/w), extract concentration 75 % (v/v) and CaCl₂ solution of 2 % (w/w).

Keywords: microencapsulation, industrial hemp, optimization, polyphenols, antioxidant activity

Thesis contains: 58 pages, 22 figures, 11 tables, 63 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Maja Benković, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD Tamara Jurina, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
2. PhD *Maja Benković*, Assistant professor
3. PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor
4. PhD *Davor Valinger*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 29 November 2019.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA (Cannabis sativa L. subsp. sativa)	2
2.1.1. Karakteristike industrijske konoplje	2
2.1.2. Kemijski spojevi industrijske konoplje	3
2.1.3. Povoljan utjecaj industrijske konoplje na ljudsko zdravlje	5
2.2. MIKROINKAPSULACIJA.....	6
2.2.1. Osnove mikroinkapsulacije	7
2.2.2. Metode mikroinkapsulacije	8
2.2.3. Svrha mikroinkapsulacije	9
2.2.4. Učinkovitost mikroinkapsulacije	10
2.2.5. Primjena mikroinkapsulacije	11
2.3. OPTIMIRANJE UVJETA PROCESA.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI.....	14
3.1.1. Reagensi i otapala	14
3.1.2. Aparatura i pribor:	14
3.2. METODE	15
3.2.1. Proizvodnja tekućeg ekstrakta industrijske konoplje	15
3.2.2. Proizvodnja mikroinkapsuliranog ekstrakta industrijske konoplje.....	16
3.2.3. Fizikalna svojstva mikrokapsula.....	17
3.2.3.1. TDS i vodljivost	17
3.2.3.2. Analiza veličine čestica.....	17
3.2.3.3. Analiza teksture.....	17
3.2.3.4. Suha tvar mikrokapsula.....	18
3.2.3.5. Izgled mikrokapsula: površina i presjek	18
3.2.4. Kemijska svojstva mikrokapsula	18
3.2.4.1. Priprema mikrokapsula za kemijske analize	18
3.2.4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	18
3.2.4.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	20
3.2.4.4. Određivanje ukupnih polifenola TPC metodom	21
3.2.5. Otpuštanje aktivnih tvari iz mikrokapsula.....	22
3.2.6. Statistička obrada podataka i optimiranje.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. KARAKTERISTIKE POČETNOG EKSTRAKTA.....	24
4.2. FIZIKALNA SVOJSTVA	25
4.2.1. Veličina čestica	25
4.2.2. Analiza teksture	27
4.2.3. Suha tvar mikrokapsula	29
4.2.4. Izgled mikrokapsula: površina i presjek	30
4.3. KEMIJSKA SVOJSTVA	32
4.3.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i FRAP metodom	32
4.3.2. Određivanje ukupnih polifenola TPC metodom.....	34
4.4. OTPUŠTANJE AKTIVNIH TVARI IZ MIKROKAPSULA	36
4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	39
4.6. OPTIMIRANJE UVJETA PROCESA.....	47
5. ZAKLJUČCI	51
6. LITARATURA	52

1. UVOD

Popularnost industrijske konoplje uzela je maha posljednjih godina i prehrambene industrije nailaze na različite načine na koje bi se mogla iskoristiti povoljna svojstva ove biljke. Uz sva znanja o metodama mikroinkapsulacije, ideja “zarobljavanja” bioaktivnih komponenata industrijske konoplje u obliku mikrokapsula našla je put do realizacije. Brojne bolesti poput anoreksije, multiple skleroze, neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, Touretteovog sindroma, te epilepsije, šizofrenije i glaukoma tretiraju se ili imaju potencijala biti tretirani nekim oblikom kanabinoida, najspecifičnijeg sastojka konoplje (Kogan i Mechoulam, 2007). Mikroinkapsulacija, kao metoda kojom se željeni sastojak inkorporira u drugu tvar prilikom čega nastaje mikrokapsula, nudi mnoga korisna svojstva proizvoda (Poshadri i Aparna, 2010). Poznato je da se u prirodi može pronaći mnogo vrsta hrane koja posjeduje određeni oblik zaštitnog sloja, a neki od njih su različito voće ili povrće poput grožđa, crvenog ribiza i rajčice čija pokožica štiti njihov unutrašnji sadržaj od vanjskih podražaja i okoliša. Njihova opna kontrolira gubitak vode, regulira disanje plodova, pruža im zaštitu od mehaničkih oštećenja i štiti ih od oksidacije i ostalih nepovoljnih vanjskih uvjeta poput vlage i svjetlosti. Ljudska domišljatost iskoristila je genijalnost prirode i usmjerila ju u razvoj tehnologije mikroinkapsuliranja kao tehnike čiji konačni proizvod predstavljaju mikrokapsule, koje su upravo oponašanje te zaštitne opne (Balassa i sur., 1971). Mikroinkapsuliranje omogućuje osjetljivim materijalima da se fizički obaviju zaštitnim materijalom, kako bi se aktivni sastojci zaštitili od neželjenih međudjelovanja, vremenskih utjecaja ili gubitaka isparavanjem (Ferrándiz i sur., 2017).

U ovom radu cilj je optimirati uvjete mikroinkapsulacije ekstrakta industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) kako bi u konačnici proizvedene mikrokapsule imale što bolja fizikalna i kemijska svojstva. Eksperimentalni dio rada proveden je prema Box-Behnken dizajnu eksperimenta s tri faktora na tri razine: koncentracija otopine alginata, koncentracija ekstrakta i koncentracija otopine CaCl₂. Uzorcima su analizirana fizikalna i kemijska svojstva te su određeni optimalni uvjeti pri kojima su proizvedene mikrokapsule pokazale najbolja svojstva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)

Industrijska konoplja ili *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* biljka je iz porodice *Cannabaceae* te potječe od divlje konoplje *Cannabis ruderalis* Janich koja i danas raste u ravnicama središnje Azije oko Aralskog i Kaspijskog jezera. To je jednogodišnja, dvodomna biljka čiju su vrijednost i kvalitetu kao kultivirane biljke prepoznali još drevni Egipćani prije 6000 godina (Božić-Ostojić i sur., 2015).

2.1.1. Karakteristike industrijske konoplje

Industrijska konoplja pokazala se kroz povijest kao izrazito iskoristiva biljka od čijih je različitih dijelova moguće proizvesti široki spektar proizvoda. Od stabljike industrijske konoplje može se proizvesti više različitih proizvoda: od papira i odjeće te obuću sve do građevinskih materijala i biogoriva, dok se sjeme konoplje najčešće koristi za dobivanje konopljinog ulja koje se upotrebljava u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Božić-Ostojić i sur., 2015).

U tablici 1. prikazana je biološka klasifikacija industrijske konoplje iz koje se može vidjeti da *Cannabis sativa* L. pripada rodu *Cannabis* te spada u porodicu *Cannabaceae* (Thomas i Elsohly, 2015).

Tablica 1. Sistematika ili biološka klasifikacija industrijske konoplje (Thomas i Elsohly, 2015)

CARSTVO	<i>Plantae</i>
PODCARSTVO	<i>Tracheobionta</i>
SUPERDIVIZIJA	<i>Spermatophyta</i>
DIVIZIJA	<i>Magnoliophyta</i>
RAZRED	<i>Magnoliopsida</i>
RED	<i>Urticales</i>
PORODICA	<i>Cannabaceae</i>
ROD	<i>Cannabis</i>
VRSTA	<i>Cannabis sativa</i> L.
PODVRSTA	<i>Cannabis sativa</i> L. <i>sativa</i>

Zbog nerazumijevanja i neinformiranosti industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L. *subsp. sativa*) često se poistovjećuje s indijskom konopljom (*Cannabis sativa* L. *subsp. indica*) koja u svom sastavu sadrži znatno veći postotak psihoaktivne tvari kanabinoida tetrahidrokanabinola (THC) (Thomas i Elsohly, 2015). Najbitnija karakteristika kojom se industrijska konoplja razlikuje od indijske konoplje je količina THC-a u suhoj tvari u cvatovima te ona ne prelazi 0,3 % kod industrijske konoplje (Small i Cronquist, 1976). U ostalim vrstama *Cannabisa* moguća je prisutnost THC-a u rasponu od 1 % pa čak do 20 % suhe tvari (Grotenhermen i Karus, 1998). U Republici Hrvatskoj i ostalim državama Europske Unije (EU) dozvoljeno je uzgajati sorte industrijske konoplje koje sadrže manje od 0,2 % THC-a u suhoj tvari biljke i nalaze se na zajedničkoj sortnoj listi EU (Hrvatska Agencija za Hranu, 2015). Kako se količina THC-a mijenja tijekom različitih razvojnih stadija i životnog ciklusa konoplje, a istovremeno se koristi kao parametar koji konoplju čini industrijskom konopljom, to nekada može dovesti do nepouzdanе interpretacije. Zato, omjer kanabidiola, također bitnog kanabinoida prisutnog u konoplji, i tetrahidrokanabinola predstavlja precizniji parametar, obzirom je tijekom životnog ciklusa taj omjer konstantan i ostaje nepromijenjen (Staginnus i sur., 2014).

Tijekom svog razvoja konoplja prolazi kroz nekoliko fenoloških faza koje karakteriziraju morfološke promjene ili pojava novih organa na biljci, a u prvu fenološku fazu spada klijanje i nicanje konoplje u kojoj mlada biljka izlazi na površinu s dva kotiledona i vegetativnim vrhom u sredini. Nakon prve faze slijedi faza sporog rasta u kojoj biljka intenzivno razvija samo korijenov sustav i naraste do 20 % od svoje konačne visine. Nakon 5 tjedana od nicanja nastupa faza brzog rasta i traje od 5 do 6 tjedana, a biljka u toj fazi naraste do 60 % svoje konačne visine. Nakon faze brzog rasta slijedi cvjetanje i oplodnja i tada biljka doseže svoju maksimalnu dužinu, razvijaju se cvjetovi i to obično prvo muški, a zatim ženski, te dolazi do oplodnje. Posljednja faza je sazrijevanje koje nastupa nakon oplodnje ženskih cvjetnih organa u kojima se razvija plod, a traje 4 do 5 tjedana, ovisno o sorti i klimatskim prilikama (Gadžo i sur., 2011.).

2.1.2. Kemijski spojevi industrijske konoplje

U svom radu Turner i sur. (1980) objavili su da su poznata 421 kemijska spoja u konoplji uz napomenu da se nove komponente neprestano otkrivaju. Do danas je otkriveno čak 483 kemijskih spojeva u konoplji. Od svih spojeva, terpena je poznato čak 120 te je među njima

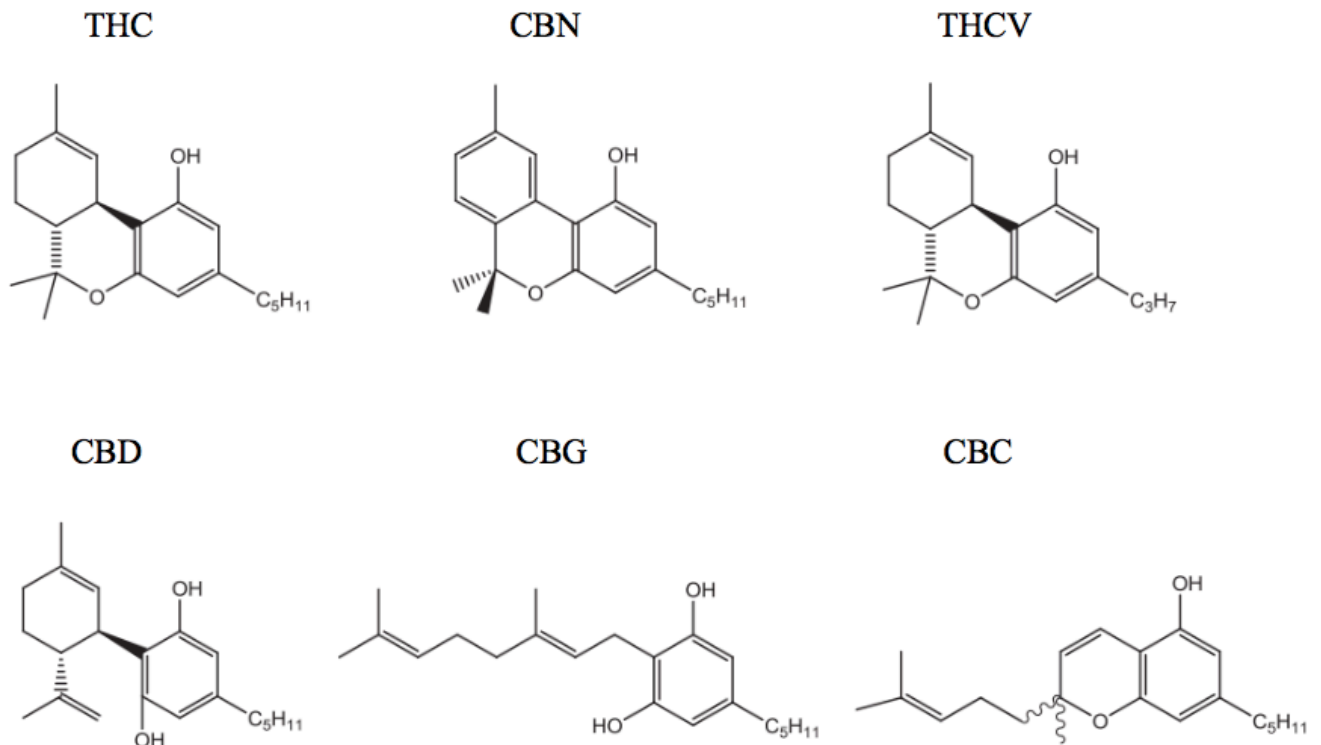
najviše monoterpena i seskviterpena, te dva triterpena i jedan diterpen. Terpeni su zaslužni za okus konoplje. Kanabinoidi predstavljaju spojeve najspecifičnije za konoplju te ih se ne može naći nigdje drugdje, odakle dolazi i sam naziv (Elsohly, 2007).

Tablica 2. Kemijske komponente koje se nalaze u *Cannabis sativa* L. i njihov broj

KOMPONENTA	BROJ
Terpeni	120
Kanabinoidi	66
Ugljikovodici	50
Šećeri	34
Dušični spojevi	27
Nekanabinoidni fenoli	25
Masne kiseline	22
Flavonoidi	21
Kiseline	21
Aminokiseline	18
Esteri i laktioni	13
Ketoni	13
Aldehidi	12
Proteini, glikoproteini i enzimi	11
Steroidi	11
Minerali	9
Alkoholi	7
Pigmenti	2
Vitamini	1
UKUPNO	483

Kanabinoidi spadaju u terpenofenole, a medicinsko djelovanje *Cannabis sativa* L. može zahvaliti upravo prisutnosti kanabinoida u svom kemijskom sastavu. Najbitniji kanabinoidi prisutni u konoplji su tetrahidrokanabinol (THC) i kanabinol (CBN). Kroz povijest, znanstvenici su većinom bili usredotočeni na THC, no posljednjih godina pojavio se interes prema proučavanju djelovanja kanabinola zbog otkrivenog potencijalnog antiepileptičkog

djelovanja. Ostali bitniji kanabinoidi prisutni u konoplji su kanabidiol (CBD), tetrahidrokanabinarin (THCV), kanabigerol (CBG) i kanabikromen (CBC) (Thomas i Elsohly, 2015).



Slika 1. Kemijske strukture kanabinoida prisutnih u konoplji redom s lijeva na desno: tetrahidrokanabinol (THC), kanabinol (CBN), tetrahidrokanabinarin (THCV), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG) i kanabikromen (CBC) (Thomas i Elsohly, 2015)

Kanabinoidi svoje biološko djelovanje temelje na interakcijama sa endokanabinoidnim sustavom koji uključuje 2 kanabinoidna receptora CB1 i CB2, koji se nalaze u središnjem živčanom sustavu, te 2 endogena liganda: anandamid (N-arahidonoil etanolamin ili AEA) i 2-arahidonoil glicerol. Endokanabinoidi igraju važnu ulogu kod mnogih psiholoških procesa poput apetita, osjeta na bol i raspoloženja (Andre i sur., 2016).

2.1.3. Povoljan utjecaj industrijske konoplje na ljudsko zdravlje

Vrijednost industrijske konoplje kao biljke koja može zadovoljiti mnoge ljudske potrebe spoznale su gotovo sve drevne kulture te se u zadnje vrijeme, prvenstveno u razvijenim zemljama, javlja interes za uzgojem ove kulture. Mnogi proizvodi proizvedeni od konoplje

pokazuju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje i sposobnost sprječavanja ili liječenja raznih tegoba i zbog svojih ljekovitih svojstava pokazuju potencijalnu uporabu u budućim liječenjima određenih bolesti. Kao lijek se od davnina upotrebljavaju plodovi i listovi. Isjeckani ili istučeni plodovi (*Fructus Cannabis*), pomiješani s vodom, liječe upale probavnih organa, mjehura te mokraćnih putova a slično se upotrebljava i lišće koje je neprijatnog mirisa te djeluje kad je skuhamo (Tomašić Paić, 2012).

Cannabis sativa L., iako nema toliko široku upotrebu, zbog čestog poistovjećivanja s korištenjem biljke u svrhe koje dovode do zlouporabe psihoaktivnih svojstava, najviše povoljnih učinaka temelji na terapijskim svojstvima kod neurodegenerativnih poremećaja (Parkinsonova bolest, Touretteov sindrom, Alzheimerova bolest, Huntingtonova bolest), afektivnih poremećaja (depresija, promjene raspoloženja, bipolarni poremećaj), poremećaja hranjenja (anoreksija, bulimija) te drugih bolesti poput epilepsije, multiple skleroze, šizofrenije i glaukoma (Kogan i Mechoulam, 2007).

Kanabidiol je pokazao puno potencijala kao terapijski agens kod pretkliničkih ispitivanja bolesti centralnog živčanog sustava, kao što su: epilepsija, neurodegenerativne bolesti, šizofrenija, afektivni poremećaji (promjene raspoloženja) te poremećaji hranjenja (Hill i sur., 2012). Kanabidiol, kanabikromen, kanabigerol, tetrahidrokanabinol i kanabinol pokazali su potencijalnu antibakterijsku aktivnost u suzbijanju *Staphylococcus aureus*, multirezistentne bakterije koja među svojom višestrukom otpornošću na lijekove posjeduje antimikrobnu rezistenciju na meticilin (Appendino i sur., 2008).

U svom radu, Ali i sur. (2012) dokazali su da je ulje sjemenki *Cannabis sativa* pokazalo antibakterijsku aktivnost prema *Bacillus subtilis* i spomenutoj *Staphylococcus aureus*, a i aktivnosti prema *Escherichiji coli* te *Pseudomonas aeruginosa*, što je dosta slično rezultatima koje su dobili Novak i sur. (2001) koji također navode antibakterijsko djelovanje ulja biljke *Cannabisa sativa* L. protiv spomenutih bakterija.

2.2. MIKROINKAPSULACIJA

Mikroinkapsulacija ima veliku ulogu u razvoju proizvoda, kako prehrambene tako i farmaceutske industrije, a cilj joj je ugradnja određene komponente, najčešće željene bioaktivne supstance u drugu tvar (Yusop i sur., 2017). Proces mikroinkapsulacije podrazumijeva postupak ugradnje i oblaganja aktivnih sastojaka nekom drugom tvari kako bi se formirala mikrokapsula.

Sam proces omogućuje očuvanje bioaktivne tvari unutar membrane odnosno odabranog nosača (Obidike i Emeje, 2011).

2.2.1. Osnove mikroinkapsulacije

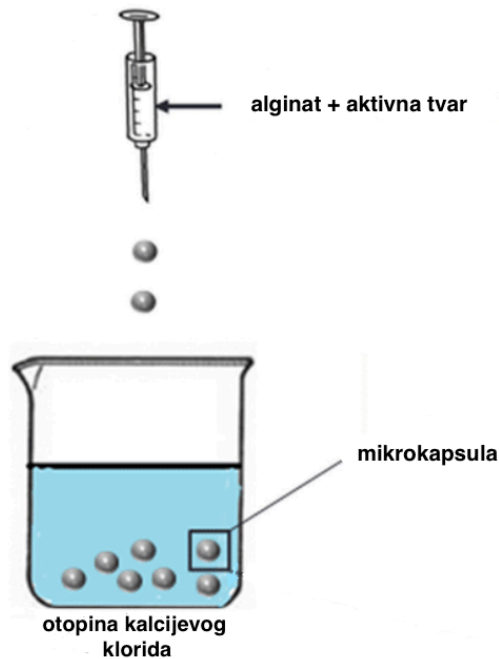
Mikroinkapsulacijom dolazi do uspostavljanja fizičke barijere oblikovanjem zaštitnog sloja oko materije koju želimo imobilizirati. Materijal koji se koristi za obavijanje (membrana, matriks, ljuska ili nosač) mora biti netoksičan, biorazgradiv, jestiv i mora imati sposobnost stvaranja barijere između unutarnje faze i okoliša, te služiti kao fizički otpor otpuštanju aktivne tvari i minimalizirati mogućnost kontaminacije. Materijali mogu biti odabrani iz širokog raspona prirodnih i sintetičkih polimera, uključujući ugljikohidrate (škrob, modificirani škrob, saharoza, celuloza, dekstrin i kitozan), proteine (želatina, gluten, albumin, kazein), gume (karagenan, guma arabika, alginat), lipide (monogliceride i digliceride, parafin, vosak, hidrogenirana ulja i masti) ili anorganske materijale (kalcijev sulfat i silikati). Ispravan odabir materijala za proizvodnju mikrokapsula vrlo je važan jer utječe na učinkovitost i stabilnost inkapsulacije (Silva i sur., 2014). Među mnogim materijalima koji se mogu koristiti kao nosači u procesu mikroinkapsulacije najviše su pozornosti privukli natrijev alginat i kitozan zbog svoje izvrsne biokompatibilnosti (Belščak-Cvitanović i sur., 2011). Natrijev alginat je natrijeva sol alginske kiseline dobivena od smeđih algi kao što su *Laminaria digitata* i *L. hyperborica* a sastoji se od β -1,4-D-manuronske kiseline i α -1,4-L-guluronske kiseline. Alginat ima sposobnost formiranja gela koji u ulozi nosača ima sposobnost kontroliranog oslobađanja aktivne tvari (Yoo i sur., 2006).

Imobilizirana tvar unutar matriksa mikrokapsule naziva se aktivna tvar, jezgra ili punjenje a najčešće su to ekstrakti ljekovitih bilja, vitamini ili enzimi. Upravo jednu od prednosti mikroinkapsulacije predstavlja činjenica da se komponente koje se nalaze u tekućem agregatnom stanju te osjetljivije i nestabilnije supstance mogu uspješno inkorporirati u mikrokapsule čime dobivamo čvrsti konačan proizvod praktičnije uporabe. Također, reaktivni, osjetljivi ili isparljivi dodaci (vitamini, kulture, okusi) mogu se mikroinkapsulacijom, uz pažljivo podešavanje svojstava s kontroliranim oslobađanjem, oformiti u stabilne proizvode sa željenim svojstvima (Desai i Park, 2005).

2.2.2. Metode mikroinkapsulacije

Do danas je poznat velik broj različitih metoda mikroinkapsuliranja, a korištenje pojedine metode ovisi o primjeni, ali i o veličini i obliku željenih mikrokapsula, potrebnim kemijskim i fizikalnim svojstvima, načinu kontroliranog otpuštanja i opsegu proizvodnje (Estevinho i sur., 2013). Najrasprostranjenija tehnika svakako je sušenje raspršivanjem koje se može provoditi u struji vrućeg ili hladnog zraka, a u ostale poznate mikroinkapsulacijske tehnike ubrajaju se ekstruzija, koacervacija, kokristalizacija, ekspanzija superkritičnih fluida, mikroinkapsuliranje fluidiziranih čestica i stvaranje mikrokapsula kompleksom citodekstrina (Byun i sur., 2010). Razlozi široke primjene sušenja raspršivanjem u prehrambenoj industriji je prvotno ekonomska isplativost o čemu svjedoči podatak da je oko 80-90 % mikroinkapsuliranih tvari dobiveno upravo primjenom sušenja raspršivanjem. Danas se sušenje raspršivanjem primjenjuje u farmaceutskoj, kozmetičkoj, te sve više i u prehrambenoj industriji za proizvodnju praškastih proizvoda poput mlijeka u prahu, jaja, kave, voćnih kaša i slično (Nedović i sur., 2011).

Jedna od jednostavnijih metoda mikroinkapsuliranja aktivne tvari u alginatnom matriksu je metoda kapanja. Kapljice se formiraju pomoću ekstrudera ili ručno pomoću igle spojene na špricu. Djelovanjem gravitacije, nakon istiskivanja ekstrakta u koji je dodan alginat, formiraju se kapljice koje zatim padaju u pripremljenu otopinu čime se površina kapljica automatski skrućuje (Vemmer i Patel, 2013). Veličina mikrokapsula ovisi o promjeru igle, protoku i protoku zraka ukoliko je primijenjen, ali i karakteristikama materijala koji se koristi za imobilizaciju (Prüsse i sur., 2008). Na slici 2. prikazana je shema formiranja mikrokapsula kapanjem u otopinu kalcijevog klorida koja se i najčešće koristi kao otopina kod ove metode (Yang i sur., 2014).



Slika 2. Shematski prikaz procesa formiranja mikrokapsula kapanjem alginata pomiješanog sa aktivnom tvari u otopinu kalcijevog klorida (Yang i sur., 2014)

2.2.3. Svrha mikroinkapsulacije

Prehrambena industrija mikroinkapsulaciju primjenjuje iz više korisnih razloga među kojima je najvažniji zaštita osjetljive supstance tj. jezgre mikrokapsule od degradacije izazvane izlaganjem okolišu (temperatura, vlaga, svjetlost) (Desai i Park, 2005.) Membrana omogućuje očuvanje stabilnosti proizvoda uz istovremeno produljenje roka trajanja proizvedenih mikrokapsula jer se membranom postiže stabilizacija stanica tj. poboljšava se njihova aktivnost i stabilnost tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja. Postupak inkapsulacije pridonosi dodatnoj zaštiti stanica laktobacila i bifidobakterija tijekom procesa rehidracije i liofilizacije (Kim i sur., 1996). Također, ukoliko aktivna tvar koja je imobilizirana ima nizak prag isparavanja, mikroinkapsulacijom se reducira proces isparavanja aktivne tvari. Neke od prednosti predstavljaju mogućnost promjene fizikalnih svojstava kao što su prelazak tvari iz tekućeg u čvrsto stanje za lakše rukovanje te sposobnost kontroliranog otpuštanja tvari i maskiranje organoleptičkih svojstava kao što su boja, okus ili miris punjenja (Poshadri i Aparna, 2010). Mikrokapsule također imaju sposobnost izolacije dvaju komponenti koje su nespojive, a trebaju koegzistirati u istom mediju te navode sposobnost modifikacije gustoće (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

Inkapsulacija daje mogućnost proizvođaču da postigne željenu kinetiku oslobađanja, bilo to polagano otpuštanje aktivnih tvari tijekom duljeg vremena ili instantno otpuštanje u određenom trenutku. Upravo to otpuštanje sastojaka hrane na pravom mjestu i u pravo vrijeme ključna je funkcionalnost koja pažljivim kombiniranjem varijabli dovodi do proizvodnje konačnog produkta željenih karakteristika (Desai i Park, 2005).

2.2.4. Učinkovitost mikroinkapsulacije

Na učinkovitost mikroinkapsulacije utječe više različitih parametara: koncentracija polimera, topljivost polimera u organskom otapalu, topljivost organskog otapala u vodi, omjer diskontinuirane i kontinuirane faze i brzina uklanjanja otapala (slika 3) (Yeo i Park, 2004).



Slika 3. Parametri koji utječu na učinkovitostst mikroinkapsulacije (Yeo i Park, 2004)

Topljivost polimera u organskim otapalima određuje brzinu učvršćivanja polimera u procesu formiranja mikrokapsula što utječe na svojstva mikrokapsula kao što su porozitet matriksa i samu efikasnost mikroinkapsulacije. U radu Mehta i sur. (1996), polimerima relativno visokih topljivosti u metilen kloridu koji je korišten kao otapalo, trebalo je duže vremena za očvršćivanje što je rezultiralo niskom efikasnošću. Dakle, što je topljivost polimera u otapalu niža, efikasnost mikroinkapsulacije raste (Mehta i sur., 1996). Topljivost organskog otapala u vodi također igra važnu ulogu u procesu mikroinkapsulacije. Metilen klorid pokazuje puno bolju efikasnost od kloroforma ili benzena, što je objašnjeno činjenicom da je metilen klorid topljiviji u vodi od kloroforma ili benzena koji je praktički netopljiv u vodi. Visoka topivost u vodi omogućava brže prenošenje mase između disperzne i kontinuirane faze što rezultira bržim očvršćivanjem mikrokapsula (Bodmeier i McGinity, 1988). Jedan od parametara koji potpomažu višoj učinkovitosti je viša koncentracija polimera koji se koristi kao matriks. Kada je koncentriraniji, polimer omogućava brže očvršćivanje mikrokapsule sukladno čime se povećava i efikasnost. (Rafati i sur., 1997). Mehta i sur. (1996) u svom radu navode kako se učinkovitost mikroinkapsulacije povećala sa 53,1 % na 70,9 % nakon što se koncentracija polimera povećala sa 20 % na 32,5 %. Učinkovitost inkapsulacije raste povećanjem volumena kontinuirane faze, odnosno, veći omjer disperzne i kontinuirane faze rezultirat će većom učinkovitošću (Li i sur., 1999). Veliki volumen kontinuirane faze omogućava visoki koncentracijski gradijent na granicama faza čime dolazi do brzog očvršćivanja (Sah, 1997). Metode i stupanj uklanjanja otapala također utječu na očvršćivanje kao i na morfologiju mikrokapsula. Otapalo se može ukloniti isparavanjem ili ekstrakcijom u kontinuiranoj fazi (Mehta i sur., 1994). S obzirom na sve čimbenike koji mogu utjecati na mikroinkapsulaciju, potrebno je pažljivo optimirati uvjete kako bi se postigla što veća učinkovitost.

2.2.5. Primjena mikroinkapsulacije

Različite istraživačke i razvojne aktivnosti posvećene unapređenju tehnologije mikroinkapsulacije proizvode širom svijeta sve veći broj komercijalno uspješnih proizvoda baziranih na tehnici mikroinkapsuliranja. Proizvodi proizvedeni ovom metodom primjenu su pronašli u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji te u biotehnologiji (Thies, 2004). Mikrokapsule znaju biti prisutne u mnogim proizvodima za osobnu njegu i kozmetičkim proizvodima upravo zbog tehnologije očuvanja sastojaka te se tako na tržištu mogu pronaći kreme kod kojih se sastojci oslobađaju tek u dodiru s kožom, serumi s mikroinkapsuliranim

kompleksom vitamina ili dezodoransi koji oslobađaju aktivnu tvar kada se nađu u kontaktu s vlažnom kožom kao rezultat znojenja prilikom čega se i aktiviraju (Kiyama i sur., 1998). U biotehnologiji, mikroinkapsulacija naišla je na primjenu u proizvodnji probiotika koji su sve popularniji i traženiji u prehrambenoj industriji a kako mikroinkapsulacija može pružiti široki opseg funkcionalnih proizvoda na tržištu, tako se upotrebljava i za hranu koja sadrži inkapsulirane probiotske stanice. Čokolada koja sadrži inkapsulirane probiotičke stanice koju proizvodi belgijska tvrtka Barry Callebaut, te sladoledi s inkapsuliranom probiotičkom kulturom stanica koje proizvode tvrtke Dos Pinos, Unilever i Hansen samo su neki od tih proizvoda (Nazzaro i sur., 2012). Osim proizvoda koji se već nalaze na tržištu i tehnika koje se već primjenjuju u industriji, mnoštvo tehnika se tek usavršava i sama primjena u prehrambenoj industriji i dalje se istražuje. Stojanović i suradnici (2012) proveli su inkapsulaciju ekstrakta timijana uz kalcijev alginat s ciljem poboljšanja potencijala mikrokapsula u očuvanju polifenola i aktivnih tvari u prehrambenim proizvodima. Izolirane antocijanine iz Saskatoon bobice mikroinkapsulirali su 2018. godine Zeng i suradnici s ciljem očuvanja njihovih terapijskih i protuupalnih svojstava.

2.3. OPTIMIRANJE UVJETA PROCESA

Optimiranje uvjeta kako bi se utvrdilo koje su naoptimalnije vrijednosti parametara koji utječu na proces nužni su za samu učinkovitost procesa. Optimiranjem se ostvaruje najbolji mogući rezultat na temelju najboljeg mogućeg izbora odabranih kriterija, a sama riječ dolazi od latinske riječi *optimus* što znači najbolji. Jedan od načina optimiranja je izrada profila poželjnosti (desirability profiles) za pronalazak optimalnih vrijednosti onih varijabli koje utječu na proces (Shah i sur., 2008).

Tradicionalno se postupak optimiranja provodio radi praćenja utjecaja jednog parametra u vremenu na eksperimentalni odziv, gdje bi jedan faktor bio podložan promjeni, a drugi konstantan (Bezerra i sur., 2008). U novije vrijeme se u optimiranju procesa koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa, a jedna od njih je i metoda odzivnih površina (eng. Response Surface Methodology, RSM) (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005) koja predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika korisnih za razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa u kojima je cilj definirati odnos između varijable odziva i neovisnih varijabli (Bezerra i sur., 2008). RSM ima važnu ulogu u dizajnu, razvoju i formiranju novih proizvoda, kao i u unaprjeđivanju postojećih

proizvoda. Metoda definira utjecaj neovisnih varijabli, samih ili u kombinaciji, na procese. Uz analizu efekata neovisnih varijabli, ova eksperimentalna metodologija također razvija matematički model (Baş i Boyacı, 2007; Šain, 2019).

Kada se razvija proizvod čije karakteristike ovise o svojstvima upotrijebljenih sastojaka od kojih se taj proizvod sastoji, proizvodnja najbolje moguće verzije proizvoda zahtjeva od proizvođača da se ustanove utjecaji sastojaka na svaku pojedinu karakteristiku konačnog proizvoda te zatim odrede optimalne vrijednosti varijabli za dobivanje kvalitetnog proizvoda (Statistica Help, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu ovog rada za izradu mikropkapsula korišteni su:

- natrijev alginat (Fisher Scientific U.K. Limited, Bishop Meadow Road, Loughborough)
- kalcijev klorid (GRAM-MOL d.o.o., Črnkovečka 4, 10000 Zagreb, Croatia)
- industrijska konoplja (*Cannabis sativa L.*), berba 2018, uzgojena u Međimurskoj županiji (OPG Levačić, Prelog, Hrvatska)

3.1.1. Reagensi i otapala

Korišteni reagensi i otapala:

- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3) (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, p.a. (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- klorovodična kiselina 37 % (Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska)
- natrij acetat-trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- octena kiselina 99,5 % (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja)
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- željezo(III)-klorid-heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (GRAM-MOL d.o.o., Črnkovečka 4, 10000 Zagreb, Croatia)
- željezo(II)-sulfat-heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka).
- galna kiselina 98 % (Acros Organics, Geel, Belgija)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox ili TE) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

3.1.2. Aparatura i pribor:

- staklene epruvete
- stalak za epruvete
- staklene pipete volumena 10 mL

- pipeta volumena 5 mL
- mikropipete volumena 100 μ L i 500 μ L
- staklene čaše
- celulozni filter papir
- menzura
- boca sisaljka
- tarionik i tučak
- pinceta
- špatula
- šprice
- igle za šprice
- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- odmjerne tikvice
- spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska)
- konduktometar SevenCompact (Mettler Toledo, Zurich, Švicarska)
- sušionik s automatskom regulacijom temperature (InkoLab, Zagreb, Hrvatska)
- eksikator (Normax, Marinha Grande, Portugal)
- analitička vaga Sartorius TE214-S0CE, (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- vorteks (Biosan Vortex V1 Plus, Riga, Latvija)
- centrifuga (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)
- mikroskop Motic B series (Motic Europe, Barcelona, Španjolska)

3.2. METODE

3.2.1. Proizvodnja tekućeg ekstrakta industrijske konoplje

Za pripremu ekstrakta korištena je industrijska konoplja (*Cannabis sativa L.*), biljka iz porodice *Cannabinaceae*. Najprije se odvaže 24 g usitnjenog osušenog bilja koje se zatim prelije sa 1200 mL destilirane vode zagrijane na temperaturu od 80 °C. Takva pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na temperaturi od 80 °C u uljnoj kupelji pri 250 rpm tijekom 30 minuta. Nakon isteka zadanog vremena ekstrakcije, uzorak se profiltrira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze te se pripremljenom vodenom ekstraktu određuju

fizikalna svojstva (pH, vodljivost, ukupne otopljene tvari-TDS), suha tvar, koncentracija ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet.

3.2.2. Proizvodnja mikroinkapsuliranog ekstrakta industrijske konoplje

Mikroinkapsulirani ekstrakti proizvode se prema uvjetima definiranim Box-Behnken dizajnom pokusa koji uključuje tri faktora na tri razine: faktor 1 je koncentracija otopine alginata (2, 3 i 4 %), faktor 2 je koncentracija ekstrakta (100, 75 i 50 %) i faktor 3 je koncentracija otopine CaCl₂ (1,5; 1,75 i 2 %). Dizajnom pokusa definirano je 17 različitih ponavljanja. Dobivene kombinacije faktora prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Box-Behnken dizajn pokusa

	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
Uzorak	% otopine alginata (w/w)	koncentracija ekstrakta (v/v)	% otopine CaCl₂ (w/w)
1	4	0,75	2,25
2	4	1	2
3	3	1	2,25
4	3	0,75	2
5	3	0,75	2
6	4	0,75	1,75
7	3	0,75	2
8	2	0,75	1,75
9	3	0,5	2,25
10	2	0,75	2,25
11	3	1	1,75
12	3	0,5	1,75
13	3	0,75	2
14	3	0,75	2
15	2	1	2
16	4	0,5	2
17	2	0,5	2

Pripremljenom ekstraktu dodaje se prah natrijevog alginata prema koncentracijama zadanim u dizajnu pokusa i 5 % (w/w) kristalne saharoze, kako bi se olakšalo otapanje alginata u ekstraktu. Otopina se dobro homogenizira na magnetnoj miješalici pri 250 rpm. Istovremeno se pripremi otopina CaCl₂, također prema koncentracijama zadanim u planu pokusa. Otopina alginata u ekstraktu se stavlja u špricu sa iglom te se ručnim istiskivanjem otopine alginata u prihvatnu otopinu CaCl₂ formiraju mikrokapsule. Nakon završene mikroinkapsulacije, mikrokapsule se ostave da se stabiliziraju u CaCl₂ tijekom 30 min. Nakon toga kapsule se profiltriraju, osuše i spremne u posudice sa otopinom CaCl₂ u ekstraktu odgovarajuće koncentracije.

3.2.3. Fizikalna svojstva mikrokapsula

3.2.3.1. TDS i vodljivost

Analiza vodljivost i TDS provedena je pomoću SevenCompact konduktometra (Mettler Toledo, Zurich, Švicarska) uranjanjem sonde u tekući ekstrakt. Na svakom uzorku provedena su 3 mjerenja.

3.2.3.2. Analiza veličine čestica

Veličina čestica određivana je iz fotografije čestica snimljenih digitalnom kamerom mobilnog uređaja (Apple Inc, Cupertino, SAD). U područje koje je fotografirano postavljena je mikroskala koja je korištena za očitavanje veličine čestica. Provedeno je 10 paralelnih mjerenja.

3.2.3.3. Analiza teksture

Analiza teksture mikrokapsula provedena je pomoću analizatora teksture TA.HDplus Texture analyser (Stable Microsystems, Godalming, Velika Britanija). Proveden je kompresijski test sa 0,5R Delrin sondom, ćelijom za opterećenje mase 5 kg pri brzini spuštanja od 0,5 mm s⁻¹ do udaljenosti 0,5 mm te uz silu od 2 g. Provedeno je 5 paralelnih mjerenja. Rezultati su prikazani kao čvrstoća (maksimalna vrijednost sile na krivulji ovisnosti sile o vremenu kompresije) i kompresibilnost kapsula (površina ispod krivulje promjene sile u ovisnosti o vremenu kompresije).

3.2.3.4. Suha tvar mikrokapsula

U suhu i označenu aluminijsku posudicu s poklopcem odvaže se određena količina uzorka ($1 - 5 \text{ g} \pm 0,0001$). Sušenje uzorka traje 3 sata pri $105 \text{ }^\circ\text{C}$ u sušioniku (InkoLab, Zagreb, Hrvatska) s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari odnosno vode. Udio vode u uzorcima računa se iz gubitka mase prema formuli:

$$\% \text{ vode} = (a - b) * 100/m \quad [1]$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad [2]$$

Gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

3.2.3.5. Izgled mikrokapsula: površina i presjek

Mikroskopiranjem mikrokapsula pomoću svjetlosnog mikroskopa Motic B series sa kamerom Moticom 3 (Moticam, Barcelona, Španjolska) i povećanjem 40x analiziran je izgled površine i presjek 17 uzoraka mikrokapsula.

3.2.4. Kemijska svojstva mikrokapsula

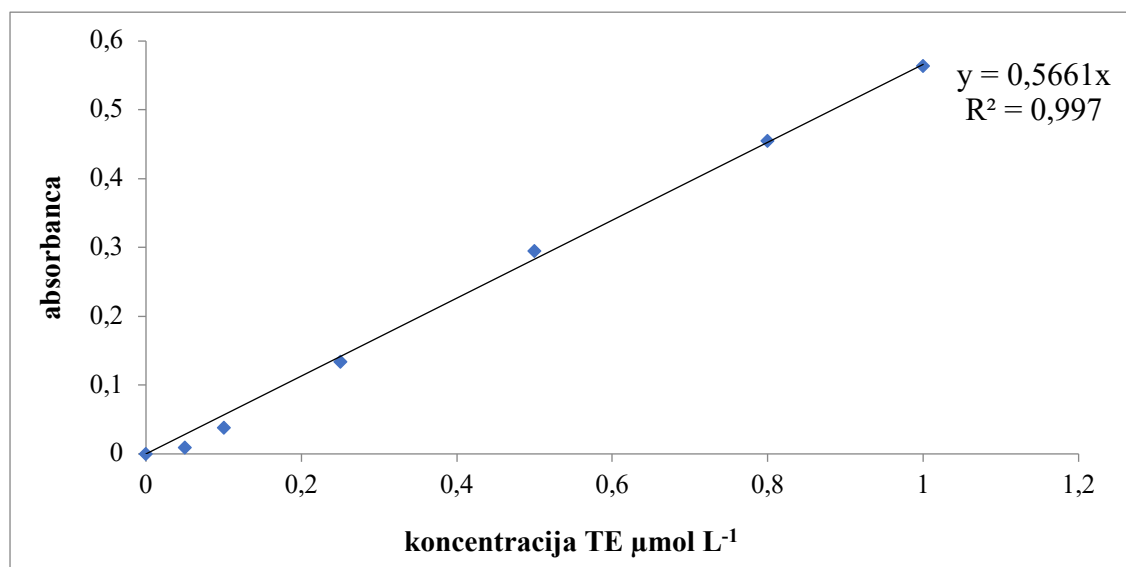
3.2.4.1. Priprema mikrokapsula za kemijske analize

Potrebno je odvagati 1 g mikrokapsula svakog od uzoraka te ih mehanički usitniti pomoću tarionika i tučka. Materijalu se zatim dodaje 15 mL destilirane vode i dobro se homogenizira. Smjesa se prebacuje u Falcon kivetu, centrifugira pri 6000 rpm (stupanj 6) (Hettich, Tuttlingen, Njemačka) te se supernatant koristi za daljnje analize.

3.2.4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost mikrokapsula ispitivana je pomoću dvije metode od kojih je jedna DPPH metoda koja se zasniva na redukciji DPPH (1,1-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala.

DPPH je stabilni slobodni radikal, koji zbog svog nesporenog elektrona intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm. Antiradikalska aktivnost ispitivanog spoja očituje se promjenom boje otopine iz ljubičaste u žutu koja je posljedica redukcije DPPH radikala. Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. Prati se reakcija između stabilnoga radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) i uzorka u kojem se mjeri antioksidacijska aktivnost. U staklenu epruvetu se otpipetira 100 μL ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 minuta u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba, umjesto uzorka, sadržava jednaki volumen metanola. Kada prođe zadano vrijeme od 30 minuta slijedi mjerenje apsorbancije na spektrofotometru pri 515 nm. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a kao standarda konstruira se pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji mM L^{-1} , odnosno baždarni pravac. Promjena apsorbancije DPPH radikala, nakon reakcije s uzorkom, računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe. Rezultati se preračunavaju prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mmol L^{-1} Trolox ekvivalenta ili TE) te se izražavaju kao molarni udio ($\mu\text{mol g}^{-1}$) TE. Za svaki uzorak potrebno je napraviti dvije paralele te se kasnije uzima srednja vrijednost.



Slika 4. Baždarni pravac za TE

Iz dijagrama je vidljivo da jednadžba pravca glasi:

$$y=0,5661x \quad [3]$$

$$R^2=0,997$$

Pri čemu je:

y=razlika apsorbancije uzorka i slijepa probe pri 515 nm

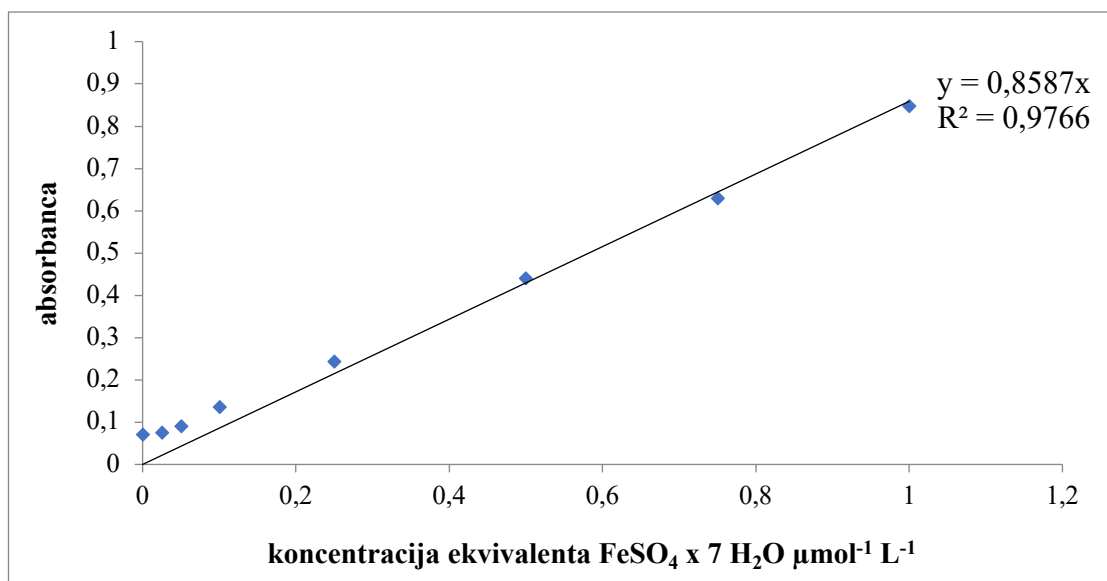
x=ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

3.2.4.3. *Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom*

FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda bazira se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt pri čemu je temelj reakcije sposobnost antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju (pH 3,6) reducira žuti kompleks željeza(III) sa 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazinom (TPTZ) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+} -TPTZ. Intenzitet nastale plave boje mjeri se spektrofotometrijski pri 593 nm. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa.

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije 300 mmol L^{-1} , otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina koncentracije 10 mmol L^{-1} te vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) koncentracije 20 mmol L^{-1} . FRAP reagens priprema se miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, tako da omjer dodanih otopina bude 10 : 1 : 1.

Za postupak mjerenja, u kivetu se pomiješa 50 μL uzorka i 950 μL FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija na pri 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka 50 μL vode pomiješa s istom količinom FRAP reagensa. Rezultati se preračunavaju prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mmol L^{-1} $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni udio ($\mu\text{mol g}^{-1}$) ekvivalenta $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$.



Slika 5. Baždarni pravac za FeSO₄

Iz dijagrama je vidljivo da jednadžba pravca glasi:

$$y=0,8587x \quad [4]$$

$$R^2=0,9766$$

Pri čemu je:

y=razlika apsorbancije uzorka i slijepe probe pri 593 nm

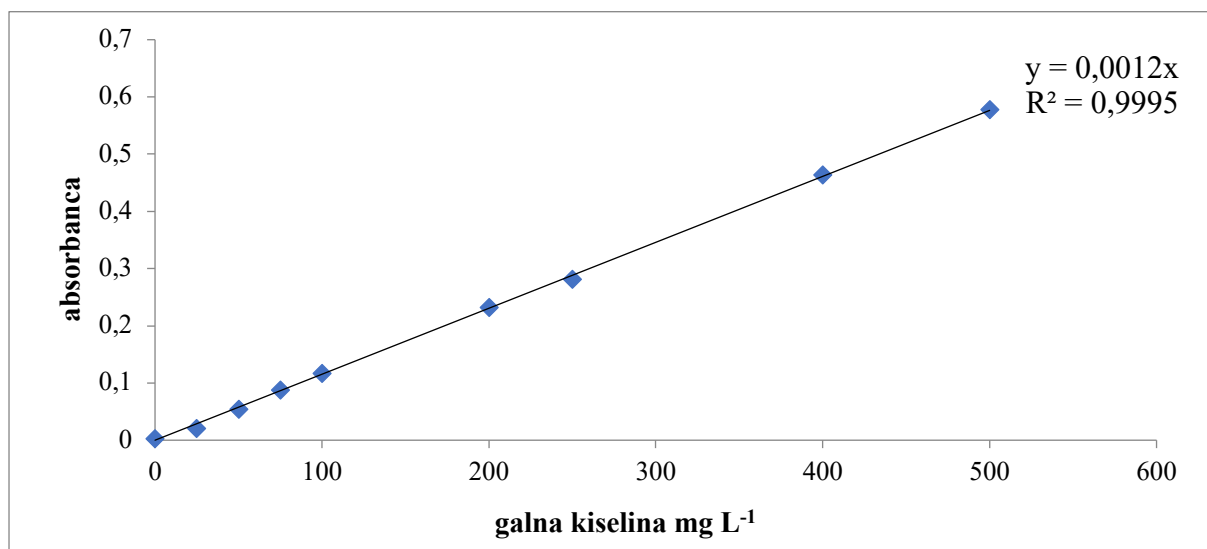
x=ekvivalent FeSO₄ x 7 H₂O (μmol L⁻¹)

3.2.4.4. *Određivanje ukupnih polifenola TPC metodom*

Ukupni fenolni spojevi u hrani ili nekom drugom biološkom uzorku kvantificiraju se temeljem reakcije fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) koji omogućava mjerenja u vidljivom području spektra te tijekom reakcije dolazi do plavog obojenja koji se zatim mjeri spektrofotometrijski pri 765 nm.

U epruvetu se otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 mL 20 %-tne otopine Na₂CO₃. Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na₂CO₃ pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na 765 nm. Osim uzorka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži 100 μL destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu

jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline ($0 - 100 \text{ mg L}^{-1}$), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) L^{-1} ili g uzorka.



Slika 6. Baždarni pravac galne kiseline

Iz dijagrama je vidljivo da jednadžba pravca glasi:

$$y=0,0012x \quad [5]$$

$$R^2=0,995$$

Pri čemu je:

y =razlika apsorbancije uzorka i slijepe probe pri 765 nm

x =ekvivalent galne kiseline ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

3.2.5. Otpuštanje aktivnih tvari iz mikrokapsula

Analiza oslobađanja aktivnih tvari iz mikrokapsula provedena je tako da su prvo pripremljeni uzorci koji su korišteni za daljnje kinetičke analize i to tako da se u 150 mL vode uroni 12 g mikrokapsula pri sobnoj temperaturi na magnetnoj miješalici namještenoj na 100 rpm. Uzorak se uzima skroz na početku uranjanja mikrokapsula u vodu, dakle pri 0 minuta te nakon 60 minuta te se zatim određuju TDS, vodljivost, FRAP, TPC i DPPH.

3.2.6. Statistička obrada podataka i optimiranje

Programski sustav Statistica (Statsoft, Tulsa, SAD) korišten je kako bi se provela statistička obrada podataka te napravio Box-Behnken dizajn eksperiment koji uključuje 3 faktora na 3 razine te u konačnici provelo optimiranje samog procesa mikroinkapsulacije. Procjena utjecaja korištenih faktora (koncentracija otopine alginata, CaCl_2 i ekstrakta) na fizikalna i kemijska svojstva mikrokapsula procijenjena je pomoću ANOVE, s time da su se statistički značajnima smatrale razlike pri $p < 0,05$.

Nadalje, kako bi se utvrdili optimalni uvjeti procesa, dobiveni rezultati podijeljeni su u 2 zasebne grupe a optimiranje je provedeno sa svakom grupom svojstava zasebno. Jedna grupa obuhvaća fizikalna svojstva mikrokapsula u koja spadaju: veličina čestica, vodljivost, TDS, tekstura i suha tvar, a druga grupa obuhvaća kemijska svojstva mikrokapsula u koja spadaju sadržaj ukupnih polifenola, te antioksidacijska aktivnost.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Istraživanje u ovom radu provodilo se sa ciljem pronalaska optimalnih uvjeta mikroinkapsulacije ekstrakta industrijske konoplje pomoću natrijevog alginata. U tu je svrhu proveden Box-Behnken dizajn eksperimenta koji uključuje tri faktora na tri razine a to su koncentracija otopine alginata, koncentracija ekstrakta i koncentracija otopine CaCl₂. Ekstraktu i mikrokapsulama analizirana su fizikalna svojstva: TDS, vodljivost, suha tvar, tekstura, veličina čestica i površina i presjek mikrokapsula te kemijska svojstva: antioksidacijska aktivnost (određena pomoću DPPH i FRAP metode), udio ukupnih polifenola, učinkovitost mikroinkapsuliranja te oslobođena antioksidacijska aktivnost i oslobođen sadržaj ukupnih polifenola u mikrokapsulama. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

4.1. KARAKTERISTIKE POČETNOG EKSTRAKTA

U tablici 4. prikazana su fizikalna svojstva (vodljivost, TDS) i kemijska svojstva (TPC, antioksidacijska aktivnost) početnog ekstrakta koji je dalje korišten za mikroinkapsulaciju.

Tablica 4. Karakteristike početnog ekstrakta

	Vodljivost ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	TDS (mg L⁻¹)	DPPH ($\mu\text{mol TE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$)	FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4$ $\text{g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$)	TPC (mg GAE $\text{g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$)
ekstrakt	1360 ± 22	677 ± 11	10,07 ± 0,01	21,47 ± 0,01	6,00 ± 1,77

Izmjerena vrijednost vodljivosti početnog ekstrakta industrijske konoplje iznosi 1360 $\mu\text{S cm}^{-1}$ dok izmjerena vrijednost TDS iznosi 677 mg L^{-1} . Antioksidacijska aktivnost koristeći DPPH metodu iznosi 10,07 $\mu\text{mol TE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$, a koristeći FRAP metodu iznosi 21,47 $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ za 1 g mikrokapsula. Sadržaj ukupnih polifenola je 6,0 mg GAE $\text{g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$. Uspoređujući dobivene vrijednosti, u radu Šain (2019) određivana su svojstva ekstrakta industrijske konoplje pri različitim uvjetima. Kod uvjeta najslabijih onima primijenjenim u ovom radu, vrijednosti se u nekim segmentima poklapaju, dok se u drugima ne podudaraju. Uvjeti pri kojima je napravljen ekstrakt industrijske konoplje u ovom radu bili su pri temperaturi od 80 °C, trajanju od 30 minuta i miješanju od 250 okretaja u minuti. Jedan od najslabijih uvjeta ekstrakcije u radu Šain (2019) bili su pri temperaturi od 60 °C, trajanju od 25 minuta i miješanju od 250 okretaja u minuti te su rezultati ovog rada uspoređeni upravo sa rezultatima dobivenih u tim uvjetima. Izmjerene vrijednosti vodljivosti i TDS iznose 1685 $\mu\text{S cm}^{-1}$ i 845 mg L^{-1} što je nešto više od

rezultata dobivenih u ovom radu koji iznose $1360 \mu\text{S cm}^{-1}$ za vodljivost i 677 mg L^{-1} za TDS. Uspoređujući udio ukupnih polifenola određenih DPPH metodom u radu Šain dobivene vrijednosti iznose $0,190 \pm 0,005 \text{ mmol TE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ što iznosi $190 \pm 0,005 \mu\text{mol TE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ i dosta odudara od vrijednosti dobivenih u ovom radu koje iznose $10,07 \mu\text{mol TE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$. Uspoređujući udio ukupnih polifenola određenih FRAP metodom vrijednost dobivena u njenom radu koja iznosi $0,042 \pm 0,002 \mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ preračunato u $42 \pm 0,002 \mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ odudara od vrijednosti u ovom radu koje iznosi $21,4753 \mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$. Kao razlog navedenih odstupanja može se navesti primjena smjese otapala (voda/etanol) te razlike u sastavu biljnog materijala korištenog za ekstrakciju. Naime, biljni materijal koji je korišten za ekstrakciju sadržavao je sve dijelove biljke *Cannabis sativa* L., te je samim time izvjesno da se udio određenog dijela biljke u ekstrakcijskoj smjesi (stabljika, sjemenke, listovi) razlikovao od onog korištenog u radu Šain (2019).

Izmjereni udio ukupnih polifenola koji iznosi $6 \text{ mg GAE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ uspoređen je sa izmjerenim udjelom ukupnih polifenola kod ekstrakta timjana u radu Stojanović i suradnika (2012) koji je iznosio $2,01 \pm 0,02 \text{ mg GAE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ što je dosta manje od sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu industrijske konoplje. U svom radu Stojanović i sur. (2012) izmjerili su u ekstraktu timjana vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom koja je iznosila $16,59 \pm 1,06 \mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ što je slično ekstraktu industrijske konoplje iako je ta vrijednost nešto viša u ekstraktu industrijske konoplje. Iz priložene tablice vidi se da je antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom nešto veća u usporedbi s antioksidacijskom aktivnošću izmjerenom FRAP metodom.

4.2. FIZIKALNA SVOJSTVA

4.2.1. Veličina čestica

Veličina mikrokapsula dobivenih provedbom optimizacijskih pokusa prikazana je u tablici 5.

Tablica 5. Veličina čestica mikrokapsula

Uzorak	Veličina čestica (cm)
1	0,33±0,0058
2	0,33±0,0058
3	0,32±0,0100
4	0,28±0,0000
5	0,28±0,0000
6	0,32±0,0100
7	0,28±0,0000
8	0,19±0,0000
9	0,32±0,0058
10	0,24±0,0000
11	0,33±0,0058
12	0,33±0,0000
13	0,30±0,0058
14	0,28±0,0058
15	0,28±0,0000
16	0,38±0,0058
17	0,27±0,0115

Prema prikazanom u Tablici 5, promjeri proizvedenih mikrokapsula kretali su se između najmanjih 0,19 cm (uzorak 8) do najvećih 0,38 cm (uzorak 16). Uzorak 16 predstavljaju mikrokapsule čija je koncentracija otopine alginata 4 %, koncentracija ekstrakta 50 % i koncentracija otopine CaCl₂ 2 %, dok je sastav mikrokapsule uzorka 8 koncentracija otopine alginata 2 %, koncentracija ekstrakta 75 % i koncentracija otopine CaCl₂ 1,75 %. Uzorcima koji sadrže 3 % otopine alginata promjer se kreće od 0,28 do 0,33 cm. Iz priložene tablice može se zaključiti da su najveći promjeri mikrokapsula onih sa koncentracijom otopine alginata 4 % (uzorci 1, 2, 6 i 16) iz čega se vidi da najveći utjecaj na veličinu čestica ima koncentracija otopine alginata. Ovakvi rezultati u skladu su s istraživanjem Karače (2016) koja je provela analizu mikrokapsuliranog ekstrakta lista maslačka te zaključuje da povećanje koncentracije alginata kao nosača za inkapsulaciju u pravilu uzrokuje povećanje veličine formuliranih hidrogel čestica. U svom radu Park i sur. (2001) analizirali su mikrokapsule sa sadržajem ulja limuna a mikrokapsule koje su proizvedene od korištenog materijala veće koncentracije bile su

veće uslijed veće viskoznosti koja raste povećanjem koncentracije materijala koji se koristi za obavijanje.

4.2.2. Analiza teksture

U tablici 6 prikazani su rezultati analize teksture proizvedenih mikrokapsula, izraženi kao čvrstoća (maksimalna sila tijekom kompresije) i kompresibilnost kapsula (površina ispod krivulje promjene sile u ovisnosti o vremenu).

Čvrstoća

Tablica 6. Srednja vrijednost i standardna devijacija čvrstoće i kompresibilnosti mikrokapsula

Broj uzorka	Čvrstoća (N)	Kompresibilnost (N sekunda)
1	0,226±0,065	0,124±0,027
2	0,292±0,045	0,172±0,024
3	0,183±0,008	0,113±0,005
4	0,244±0,022	0,145±0,014
5	0,305±0,025	0,179±0,017
6	0,243±0,018	0,146±0,009
7	0,23±0,027	0,136±0,013
8	0,288±0,121	0,169±0,063
9	0,162±0,017	0,104±0,011
10	0,235±0,060	0,15±0,029
11	0,169±0,015	0,104±0,008
12	0,168±0,020	0,109±0,014
13	0,16±0,020	0,1±0,011
14	0,169±0,015	0,102±0,007

15	0,156±0,030	0,101±0,017
16	0,234±0,091	0,146±0,055
17	0,133±0,021	0,087±0,011

Prema podacima prikazanim u Tablici 4, vrijednosti dobivene za čvrstoću se kreću od 0,133±0,021 do 0,305±0,025 N a za kompresibilnost od 0,087 ± 0,011 do 0,179 ± 0,017 N sekunda. Najmanje vrijednosti za čvrstoću i kompresibilnost pokazao je uzorak 17 čija je koncentracija otopine alginata 2 %, koncentracija ekstrakta 50 % i koncentracija otopine CaCl₂ 2 %, a najveću čvrstoću i kompresibilnost pokazao je uzorak 5 čija je koncentracija otopine alginata 3 %, koncentracija ekstrakta 75 % i koncentracija otopine CaCl₂ 2 %. U radu Karače (2016) ispitujući teksturu kod mikroinkapsuliranih polifenolnih spojeva lista maslačka zaključeno je da su čestice pripremljene s nižom koncentracijom alginata imale su nešto nižu srednju vrijednost tvrdoće. U njenom radu tvrdoća čestica inkapsuliranih čistim 4 %-tnim alginatom iznosila je 0,15 ± 0,01 N što je nešto niže od vrijednosti dobivenih u ovom radu uspoređujući rezultate mikrokapsula koje sadrže 4 % koncentraciju alginata a to su uzorci 1,2,6 i 16. Čvrstoća za uzorak 1 iznosi 0,226 N, za uzorak 2 iznosi 0,292 N, vrijednost za uzorak 6 je 0,243 N a za uzorak 16 iznosi 0,234 N čime je vidljivo da su vrijednosti više od onih u radu Karače. Također navode da upotreba nekih (dodatnih) materijala u kombinaciji s alginatom može davati izvrsne rezultate na nekim određenim područjima i poboljšavati određene parametre inkapsulacije (Karača, 2016). Kompresibilnost mikrokapsula često se koristi za opisivanje njihovih mehaničkih svojstava. Pretpostavlja se da je opterećenje potrebno za pucanje 50 % polimernog sloja mikrokapsula najprikladniji parametar za prikaz izračunatog tlaka primijenjenog na jednu mikrokapsulu, iako ta činjenica još nije do kraja istražena (Ohtsubo i sur., 1991). Sila pucanja mikrokapsula kompleksni je parametar koji opisuje snagu cjelokupne mikrokapsule (matriks i unutrašnju tvar). Schuldt i Hunkeler (2000) navode u svom radu da napetost membrane ne ovisi o veličini čestica što se podudara sa rezultatima u ovom radu jer veličina promjera uzorka koji posjeduje najmanju čvrstoću i najmanju kompresibilnost (uzorak 17) iznosi 0,27 cm, a uzorak koji posjeduje najveću čvrstoću i najveću kompresibilnost (uzorak 5) ima veličinu promjera 0,28 cm što se ne razlikuje mnogo od promjera uzorka koji ima najmanju čvrstoću i najmanju kompresibilnost čime vidimo da veličina čestica ne utječe na ova svojstva.

4.2.3. Suha tvar mikrokapsula

Udjeli suhe tvari mikrokapsula prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Suha tvar mikrokapsula

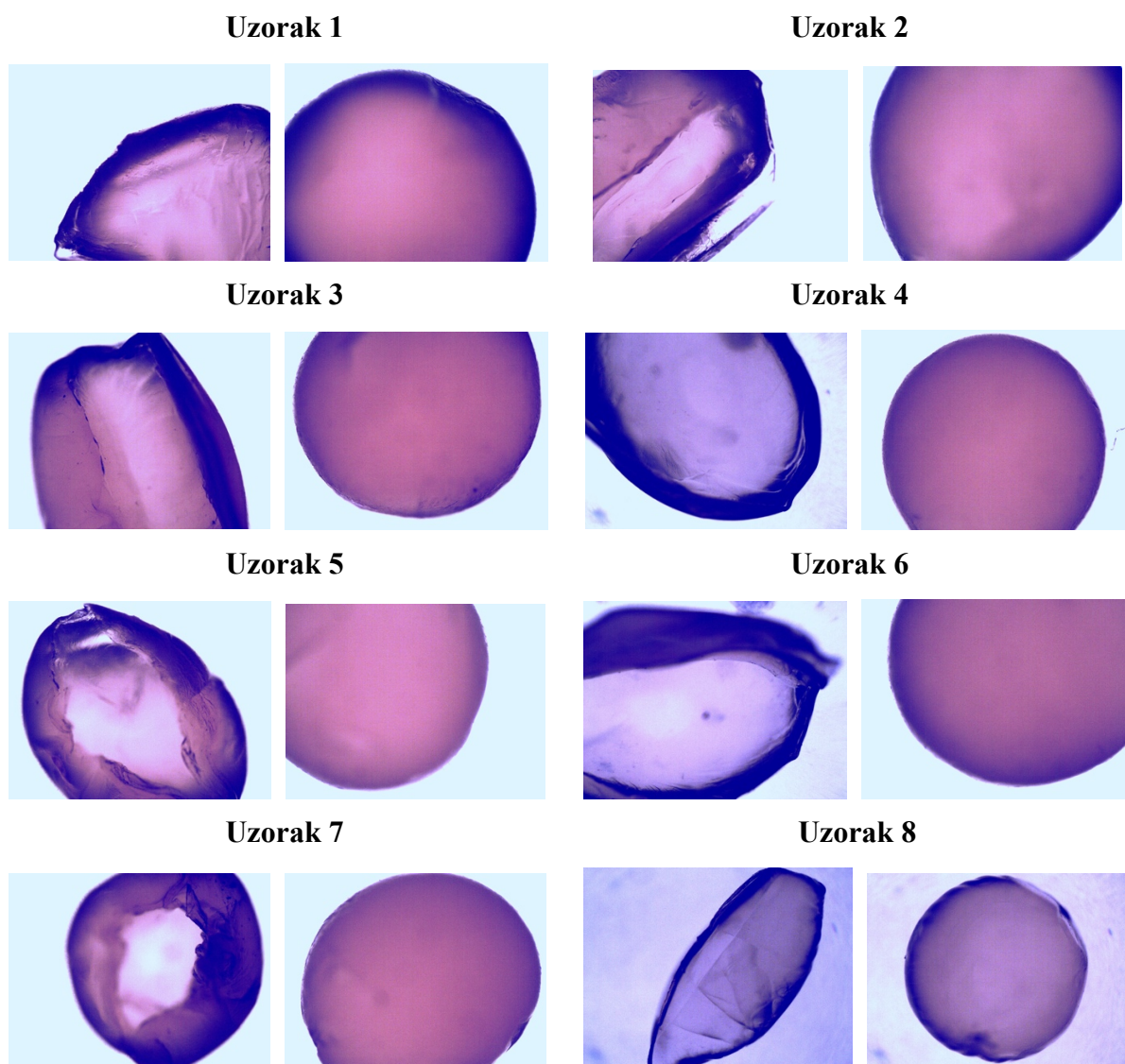
Broj uzorka	Suha tvar (%)
1	0,138±0,003
2	0,184±0,015
3	0,144±0,003
4	0,208±0,024
5	0,178±0,006
6	0,138±0,002
7	0,162±0,000
8	0,848±0,001
9	0,184±0,000
10	0,848±0,000
11	0,174±0,002
12	0,153±0,002
13	0,321±0,000
14	0,204±0,004
15	0,210±0,004
16	0,397±0,001
17	0,300±0,008

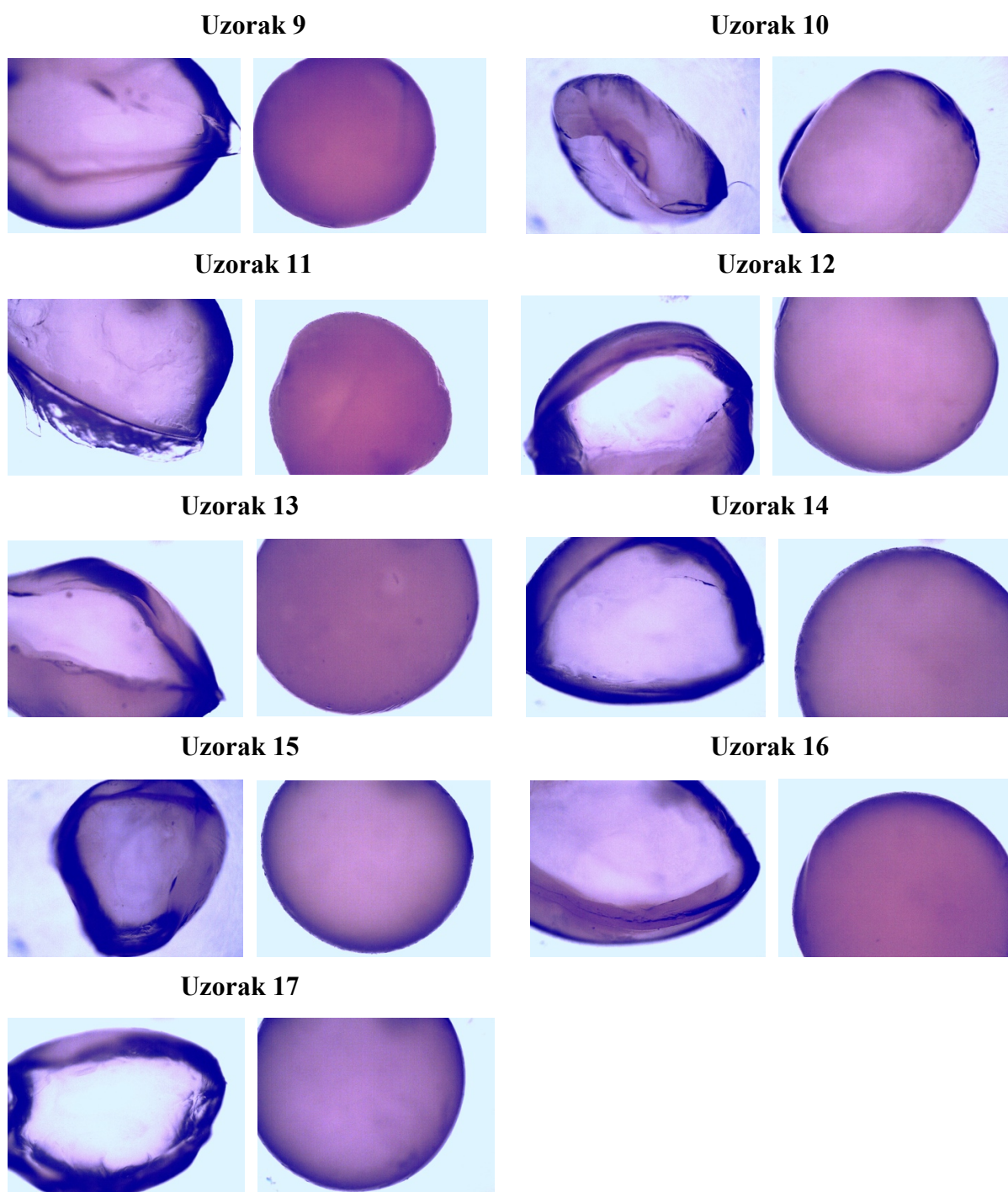
Udjeli suhe tvari u mikrokapsulama kreću se od najmanje vrijednosti koja iznosi 0,138 ± 0,003 (uzorak 1) pa sve do najviše vrijednosti koja iznosi 0,848 ± 0,001 (uzorak 10). Najveći udio suhe tvari sadrže uzorci 8 i 10 koji su relativno sličnog sastava i čija je koncentracija otopine alginata 2 % i koncentracija ekstrakta 75 % dok koncentracija otopine CaCl₂ za uzorak 8 iznosi 1,75 % a za uzorak 10 je 2,25 % iz čega se može zaključiti da koncentracija otopine CaCl₂ nema većeg utjecaja na udio suhe tvari u mikrokapsulama, dok koncentracija alginata ima najviše utjecaja na udio suhe tvari. Prema istraživanju Lee i Mooney (2012), mikrokapsule proizvedene od alginata imaju 22 – 44 % suhe tvari, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, uz iznimku uzoraka 8 i 10 koji imaju zamjetno višu koncentraciju suhe tvari. Ovo se može objasniti mogućom nedovoljnom polimerizacijom alginata prilikom

mikroinkapsulacije zbog koje je moguće da je dio sadržaja kapsula iscurio iz omotača te da su kapsule prilikom sušenja urušile i time pokazale izrazito visok sadržaj suhe tvari (Smrdel i sur., 2008).

4.2.4. Izgled mikroapsula: površina i presjek

Slike mikroapsula slikane su kamerom Moticam 3 montiranom na svjetlosni mikroskop Motic B series. Na slici 7 možemo vidjeti izgled površine i presjeka 17 uzoraka mikroapsula.





Slika 7. Površina i presjek uzoraka mikrokapsula

Karakterizacija površine mikrokapsula početni je korak prema razumijevanju biokompatibilnosti mikrokapsula jer kemijska i fizikalna svojstva površine kapsule određuju interakcije s komponentama okolnog medija. Čimbenici koji utječu na interakciju između površine mikrokapsule i ostalih komponenti biološkog sustava su kemijski sastav, ionske skupine i gustoća naboja, hidrofilitnost, hidrofobnost, morfologija i hrapavost površine. Mikrokapsule je važno adekvatno skladištiti jer tokom skladištenja može doći do promjene

svojstava membrane i njeno skupljanje čime gubi početnu strukturu (Schuldt i Hunkeler, 2000). U radu Stojanović i suradnici (2012) površinu mikrokapsula dobivenih od alginata u koje je inkorporiran ekstrakt timjana karakteriziraju prilično glatkom. Navode da uslijed sušenja dolazi do liofilizacije tokom koje se urušavaju stjenke pora te mikrokapsule gube oblik i dolazi do njihovog sužavanja. Struktura takvih osušenih i liofiliziranih mikrokapsula nije pravilnog oblika i spužvaste je teksture (Stojanović i sur., 2012). Mali gubitak strukture možemo vidjeti kod uzoraka 10 i 12 čime se vidi da su se mikrokapsule djelomično skupile iz razloga jer su neko vrijeme provele izvan otopine kalcijevog klorida u kojem su bile skladištene. Iz slike 4. vidi se da je površina mikrokapsula glatka, bez vidljivih pora ili otvora sa ponekim udubljenjima. Oblik mikrokapsula je okrugao a najpravilnije mikrokapsule su uzorak 15 i uzorak 17. Iz presjeka mikrokapsula možemo vidjeti da je unutrašnjost šuplja a debljina omotača varira među različitim uzorcima. Najtanji omotač posjeduje mikrokapsula uzorka 8, a najdeblje omotače posjeduju mikrokapsule uzorka 12 i 14.

4.3. KEMIJSKA SVOJSTVA

4.3.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i FRAP metodom

U tablici 8 prikazane su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti odnosno, koncentracije TE u μmol ovima po gramu suhe tvari za 1 g mikrokapsula kod DPPH metode, te koncentracije FeSO_4 u μmol ovima po gramu suhe tvari za 1 g mikrokapsula kod FRAP metode.

Tablica 8. Antioksidacijska aktivnost mikrokapsula određena DPPH i FRAP metodom

Broj uzorka	DPPH ($\mu\text{mol TE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ za 1 g mikrokapsula)	FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ za 1 g mikrokapsula)
1	1,9738±0,0002	1,6161±0,0001
2	1,6591±0,0004	1,5852±0,0000
3	2,0592±0,0001	1,1752±0,0002
4	0,7369±0,0008	0,9254±0,0003
5	0,3145±0,0000	1,3599±0,0001
6	0,9321±0,0001	1,9704±0,0001
7	0,4648±0,0001	1,5083±0,0000
8	0,6073±0,0000	0,3845±0,0000

9	0,5689±0,0001	1,1748±0,0002
10	0,6513±0,0000	0,515±0,0000
11	1,0514±0,0000	1,833±0,0001
12	0,9811±0,0000	1,0445±0,0000
13	0,3725±0,0000	0,9228±0,0000
14	0,6333±0,0000	1,9071±0,0001
15	0,8037±0,0000	1,817±0,0001
16	0,7062±0,0002	0,7377±0,0000
17	0,4343±0,0000	0,8119±0,0000

Iz tablice 8 vidi se antioksidacijska aktivnost mikrokapsula određena DPPH metodom kreće od najmanje vrijednosti od $0,3145 \pm 0,0000$ (uzorak 5) do najveće vrijednosti od $2,0592 \pm 0,0001$ $\mu\text{mol TE g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ za 1 g mikrokapsula (uzorak 3). Antioksidacijska aktivnost mikrokapsula određena FRAP metodom kreće se od najmanje vrijednosti od $0,3845 \pm 0,0000$ (uzorak 8) do najveće vrijednosti od $1,9704 \pm 0,0001$ $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$ za 1 g mikrokapsula (uzorak 6). Prema DPPH metodi određivanja antioksidacijske aktivnosti koja se temelji na redukciji DPPH slobodnog radikala najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak 3 čija je koncentracija otopine alginata 3 %, koncentracija ekstrakta 100 % i koncentracija otopine CaCl_2 2,25 %, dok je prema FRAP metodi, koja se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina, najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao uzorak 6 čija je koncentracija otopine alginata 4 %, koncentracija ekstrakta 75 % i koncentracija otopine CaCl_2 1,75 %. Prema literaturnim podacima (Kukina, 2019), DPPH i FRAP metode u pravilu pokazuju sličan trend izmjerenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. U ovom je slučaju do malih razlika u detektiranim antioksidansima u uzorcima moglo doći kao rezultat same pripreme uzoraka. Naime, budući da su otopine mikrokapsula pripremljene gnječenjem, otapanjem u vodi i centrifugiranjem, moguće je da je u supernatantu nakon centrifugiranja zaostao poneki netopljivi dio mikrokapsula koji je utjecao na razlike u trendovima između antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom. Kao rješenje ovog problema, u literaturi se navodi otopina natrijevog citrata kao prikladniji medij za otapanje mikrokapsula i njihove pripreme za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Belščak-Cvitanović i sur., 2017).

Belščak-Cvitanović i suradnici (2016) navode da je učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom u česticama na bazi alginata s inkapsuliranim ekstraktom maslačka iznosila oko 50 % za čisti 2 %-tni alginat i oko 75 % za alginat „pojačan“

izolatima proteina sirutke. Korištenjem čistog 4 %-tnog i 5 %-tnog alginata u svrhu formuliranja inkapsulacijskog nosača također su dobivene vrijednosti učinkovitosti zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta oko 50 %, iz čega su zaključili da promjena koncentracije alginata nema prevelikog utjecaja na učinkovitost zadržavanja antioksidacijskog kapaciteta u formuliranim mikročesticama.

4.3.2. Određivanje ukupnih polifenola TPC metodom

TPC metoda se koristi kako bi se odredio udio ukupnih polifenola u željenom uzorku. U tablici 9 se mogu vidjeti vrijednosti TPC za one uzorke koji su izgnječeni pomoću tarionika i tučka te homogenizirani s destiliranom vodom.

Tablica 9. Sadržaj ukupnih polifenola određen TPC metodom

Broj uzorka	TPC (mg GAE g ⁻¹ _{s.tv.})	Učinkovitost mikroinkapsulacije polifenola (%)
1	0,5707±0,0106	11,3459
2	0,7373±0,1283	10,9937
3	0,7539±0,0205	11,1195
4	0,3377±0,0421	6,641
5	0,3429±0,0033	6,7432
6	0,4337±0,0169	8,6232
7	0,3023±0,0109	5,9442
8	0,1201±0,1323	2,3371
9	0,2285±0,0063	6,7392
10	0,1001±0,0913	1,9587
11	0,4575±0,0133	6,7482
12	0,2519±0,0114	7,4311
13	0,2119±0,0018	4,1673
14	0,3876±0,0000	7,6221
15	0,399±0,0290	5,8213
16	0,1896±0,0019	5,655
17	0,1698±0,1901	4,9958

Prema podacima prikazanim u tablici 9, može se vidjeti kako se udio polifenola u mikrokapsulama kreće između 0,1001 mg GAE g⁻¹_{s.tv.} i 0,7539 mg GAE g⁻¹_{s.tv.} Najveći utjecaj

na udio ukupnih polifenola u mikrokapsulama ima koncentracija ekstrakta. Najveći udio polifenola sadrže mikrokapsule uzorka 2 i uzorka 3 koji oboje sadrže koncentraciju ekstrakta 100%. Kod uzorka 2 izračunati udio polifenola iznosi 0,7373 mg GAE g⁻¹_{s.tv.} dok kod uzorka 3 taj udio iznosi 0,7539 mg GAE g⁻¹_{s.tv.} Ostala 2 uzorka koja također sadrže 100 % koncentraciju ekstrakta također pokazuju visoke vrijednosti polifenola. S druge strane, uzorci 16 i 17 koji imaju 50 % koncentraciju ekstrakta sadrže udio polifenola 0,1896 mg GAE g⁻¹_{s.tv.} za uzorak 16 i 0,1698 mg GAE g⁻¹_{s.tv.} za uzorak 17. Vrijednosti udjela polifenola kod mikrokapsula s 75 % koncentracijom ekstrakta kreću se negdje između. Najveću učinkovitost mikroinkapsulacije, koja se izračunava kao omjer TPC određenog u mikrokapsulama nakon gnječenja i TPC određenog u ekstraktu koji je korišten za mikroinkapsulaciju, pokazali su uzorci 1 i 3.

U svom istraživanju Stojanović i suradnici (2012) proveli su mikroinkapsulaciju timjana te se udio polifenola u mikrokapsulama kretao između 1,7 i 4,1 mg GAE g⁻¹_{s.tv.} što je dosta više od dobivenih rezultata. Naime, timjan sadrži ružmarinsku kiselinu koja je najzastupljenija među svim polifenolnim spojevima u timjanu i posjeduje širok spektar biološke aktivnosti što se može vidjeti dobivenim visokim vrijednostima udjela polifenola u mikrokapsulama (Stojanović i sur., 2012).

Vrijednosti učinkovitosti mikrokapsula kreću se od najniže koja iznosi 1,9587 (uzorak 8) pa sve do najviše koja iznosi 11,3459 (uzorak 1). Najveću učinkovitost među mikrokapsulama pokazao je uzorak 1 koji u sastavu sadrži koncentraciju otopine alginata 4 %, koncentraciju ekstrakta 75 % i koncentraciju otopine CaCl₂ 2,25 %. Najmanju učinkovitost imaju uzorci 8 i 10 koji oboje imaju koncentraciju otopine alginata 2 %, koncentraciju ekstrakta 75 % a razlikuju se u koncentraciji otopine CaCl₂: kod uzorka 8 otopina CaCl₂ bila je 1,75 postotna a kod uzorka 10 bila je 2,25 postotna. Učinkovitost mikroinkapsulacije ostalih uzoraka ponaša se proporcionalno koncentraciji otopine alginata. Većom koncentracijom alginata veća je učinkovitost mikroinkapsulacije. U svom radu Zeng i suradnici (2018) na temelju rezultata dobivenih prilikom istraživanja mikrokapsuliranog ekstrakta Saskatoon bobica došli su do zaključka da učinkovitost mikroinkapsulacije prvo raste do vrijednosti 3 % otopine alginata, zatim opada povećanjem koncentracije alginata te da je neovisno o prihvatnoj otopini u kojoj se mikrokapsule formiraju. Yim i suradnici (2010) u svom radu navode da kada je što kraće vrijeme skrućivanja mikrokapsula to će se bolje očuvati antioksidansi u matriksu čime se povećava učinkovitost mikroinkapsulacije. Alginat, korišten za inkapsulaciju ukupnih polifenola lista maslačka, pokazao se veoma učinkovitim u radu Karače (2016) zbog visokog stupnja imobilizacije polifenolnih spojeva lista maslačka.

4.4. OTPUŠTANJE AKTIVNIH TVARI IZ MIKROKAPSULA

Količina aktivnih tvari otpuštenih iz mikrokapsula procjenjena je određivanjem TDS-a, vodljivosti, TPC-a i antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama nakon 60 minuta stajanja mikrokapsula u vodi na magnetnoj mješalici pri 23 °C i 100 rpm. Rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. TDS i vodljivost vodenih otopina sa uronjenim mikrokapsulama mjerene u 60. minuti te tijekom pokusa oslobađanja aktivnih tvari

Broj uzorka	TDS 60 min (mg L⁻¹)	Vodljivost 60.min. (μS cm⁻¹)
1	506	953
2	843	1692
3	765	1509
4	828	1725
5	728	1545
6	493	945
7	613	1245
8	714	1414
9	749	1511
10	795	1601
11	729	1388
12	766	1535
13	712	1425
14	596	1194
15	503	991
16	726	1461
17	516	1043

Iz navedene tablice možemo vidjeti da se izmjerene vrijednosti za TDS kreću od najmanje koja iznosi 493 (uzorak 6) do najviše koja iznosi 843 mg L⁻¹ (uzorak 2), a vrijednosti vodljivosti se kreću od 945 (uzorak 6) do 1725 μS cm⁻¹ (uzorak 4). Najveći TDS i vodljivost pokazuju mikrokapsule uzorka 2 i uzorka 4. Uzorak 2 ima TDS vrijednosti 843 mg L⁻¹ i vodljivost 1692

$\mu\text{S cm}^{-1}$, a uzorak 4 ima TDS vrijednosti 828 mg L^{-1} i vodljivost $1725 \mu\text{S cm}^{-1}$. Najviše vrijednosti TDSa i vodljivosti detektiranih u otopini nakon 60 minuta ujedno odgovaraju i najvećoj količini ispuštenih tvari iz mikrokapsule. Međutim, bitno je napomenuti da također postoje i istraživanja u kojima je utvrđeno da je prilikom stajanja mikrokapsula u vodi, pored otpuštanja bioaktivnih tvari, moguće i djelomično otapanje sastojaka omotača (Smrdel i sur., 2008), tako da se u ovom slučaju ne može s stopostotnom sigurnošću tvrditi da otopljene tvari potječu samo od bioaktivnih spojeva otpuštenih iz jezgre mikrokapsula.

Koncentracije polifenolnih spojeva i antioksidansa oslobođenih iz mikrokapsula u vodenu otopinu nakon 60 minuta prikazani su u tablici 11.

Tablica 11. Polifenoli i antioksidansi oslobođeni iz mikrokapsula nakon 60 minuta

Broj uzorka	TPC (mg GAE g⁻¹_{s.tv.})	DPPH ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$_{s.tv.} za 1 g mikrokapsula)	FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$_{s.tv.} za 1 g mikrokapsula)
1	0,1197±0,2139	0,5276±0,0008	0,4227±0,0016
2	0,1015±0,2805	0,4154±0,0004	0,3365±0,0004
3	0,1510±0,0000	0,5121±0,0000	0,4051±0,0115
4	0,0980±0,1769	0,3403±0,0005	0,2039±0,0002
5	0,0559±0,0413	0,3145±0,0001	0,2413±0,0001
6	0,0756±0,1069	0,4672±0,0007	0,3476±0,0001
7	0,0989±0,0454	0,4648±0,0008	0,2429±0,0002
8	0,0205±0,0695	0,0911±0,0001	0,0393±0,0001
9	0,0825±0,0400	0,4748±0,0003	0,2010±0,0001
10	0,0179±0,0087	0,0998±0,0003	0,0415±0,0000
11	0,1246±0,0000	0,9299±0,0021	0,4180±0,0002
12	0,0937±0,0482	0,8908±0,0015	0,2262±0,0001
13	0,0676±0,1836	0,2924±0,0000	0,1493±0,0002
14	0,1170±0,0361	0,4826±0,0013	0,1933±0,0003
15	0,1096±0,0351	0,4515±0,0002	0,3381±0,0005
16	0,0437±0,0371	0,1669±0,0000	0,1054±0,0002
17	0,0549±0,1962	0,2482±0,0002	0,1353±0,0001

Iz tablice 11 može se vidjeti da se vrijednosti polifenola koji su difundirali iz mikrokapsule u vodenu otopinu kreću od $0,0179 \pm 0,0087$ (uzorak 10) do $0,151 \pm 0,000$ mg GAE $g^{-1}_{s.tv.}$ (uzorak 3). Najveći je udio polifenola oslobođen nakon 60. minute kod mikrokapsula uzoraka 3 i 11. Uzorak 3 sadrži otopinu alginata koncentracije 3 %, koncentraciju ekstrakta 100 % i koncentraciju otopine $CaCl_2$ 2,25 %, a uzorak 11 otopinu alginata koncentracije 3 %, koncentraciju ekstrakta 100 % i koncentraciju otopine $CaCl_2$ 1,75 %. Najniže vrijednosti udjela polifenola oslobođenog nakon 60. minute pokazali su uzorci 8 i 10 koji su sličnog sastava. Uzorak 8 čija je koncentracija otopine alginata 2 %, koncentracija ekstrakta 75 % i koncentracija otopine $CaCl_2$ 1,75 % oslobodio je nakon 60. minute $0,0205 \pm 0,0695$ mg GAE $g^{-1}_{s.tv.}$ a uzorak 10 čija je koncentracija otopine alginata 2 %, koncentracija ekstrakta 75 % i koncentracija otopine $CaCl_2$ 2,25 % oslobodio je nakon 60. minute $0,0179 \pm 0,0087$ mg GAE $g^{-1}_{s.tv.}$ Stojanović i suradnici (2012) zabilježili su u svom radu da se većina polifenola oslobodila relativno brzo, već nakon 10 minuta uranjanja proizvedenih mikrokapsuliranih ekstrakta timjana u vodu kod mikrokapsula proizvedenih od natrijevog alginata i dodane saharoze, dok se kod mikrokapsula proizvedenih od natrijevog alginata i dodanog inulina, oslobađanje polifenola prolongiralo do 15. minute. U ovom radu mikrokapsule su izrađene od natrijevog alginata i 5 % (w/w) kristalne saharoze, kako bi se olakšalo otapanje alginata u ekstraktu. Pokazalo se da prisutnost saharoze u mikrokapsulama nije imala utjecaja na brzinu difuzije polifenola iz mikrokapsula što se objašnjava činjenicom da spojevi niske molekularne mase, kao što je saharoza, ne mogu ometati oslobađanje aktivne tvari iz visoko poroznog alginatnog matriksa što nije slučaj za spojeve visoke molekulske mase (Stojanović i sur., 2012).

Vrijednosti oslobođenih bioaktivnih spojeva koji posjeduju antioksidacijsku aktivnost nakon 60. minute određene DPPH metodom kreću se od $0,0911 \pm 0,0001$ (uzorak 8) do $0,9299 \pm 0,0021$ $\mu\text{mol TE } g^{-1}_{s.tv.}$ za 1 g mikrokapsula (uzorak 11). Najmanje vrijednosti oslobođene antioksidacijske aktivnosti nakon 60. minute imaju uzorci 8 i 10 koji su sličnog sastava i oboje imaju u sastavu 2 % koncentraciju alginata. Vrijednost uzorka 8 iznosi $0,0911 \pm 0,0001$ $\mu\text{mol TE } g^{-1}_{s.tv.}$ za 1 g mikrokapsula dok vrijednost uzorka 10 iznosi $0,0998 \pm 0,0003$ $\mu\text{mol TE } g^{-1}_{s.tv.}$ za 1 g mikrokapsula. Vrijednosti oslobođene antioksidacijske aktivnosti rastu porastom koncentracije alginata i slično se kreću za mikrokapsule sa 3 % i 4 % koncentracije alginata. Stojanović i suradnici (2012) potvrđuju u svom radu da oslobađanjem sadržaja ukupnih polifenola simultano raste i antioksidacijska aktivnost.

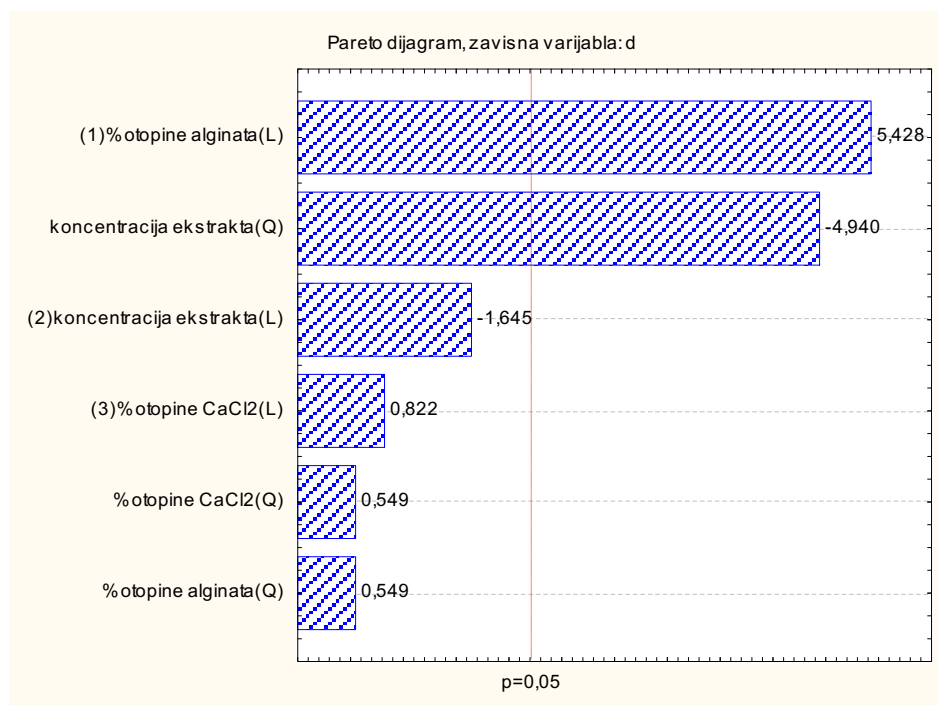
Vrijednosti oslobođene antioksidacijske aktivnosti nakon 60. minute određene FRAP metodom kreću se od $0,0393 \pm 0,0001$ (uzorak 8) do $0,4227 \pm 0,0016$ $\mu\text{mol FeSO}_4 g^{-1}_{s.tv.}$ za 1

g mikrokapsula (uzorak 1). Slično kao i kod DPPH metode, tako i kod FRAP metode najmanje vrijednosti oslobođene antioksidacijske aktivnosti nakon 60. minute imaju uzorci 8 i 10 iako se prema dobivenim rezultatima vidi da je kod ove metode osim koncentracije otopine alginata utjecaja imala i koncentracija ekstrakta. Navode da oslobađanje aktivnih tvari iz mikrokapsula prvenstveno potaknuto koncentracijskim gradijentom između mikrokapsula i otopine u kojoj se nalaze (Yim i sur., 2010).

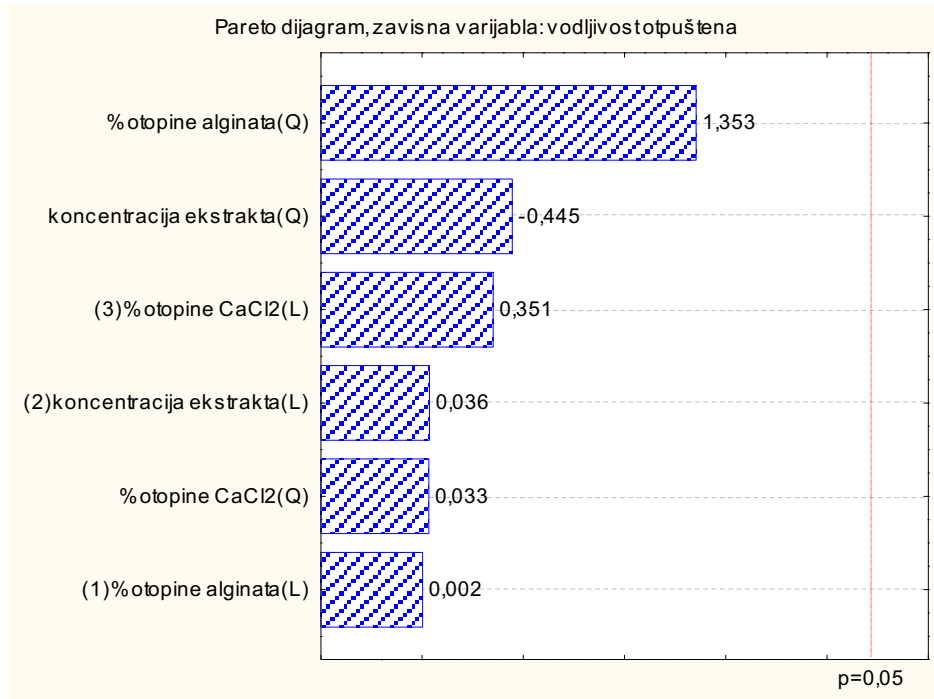
4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka, kao i Box-Behnken dizajn eksperimenta sa 3 faktora na 3 razine, provedena je u programskom sustavu Statistica. Provedena je analiza utjecaja 3 faktora a to su koncentracija otopine alginata, koncentracija ekstrakta te koncentracija otopine CaCl_2 na fizikalna i kemijska svojstva mikrokapsula.

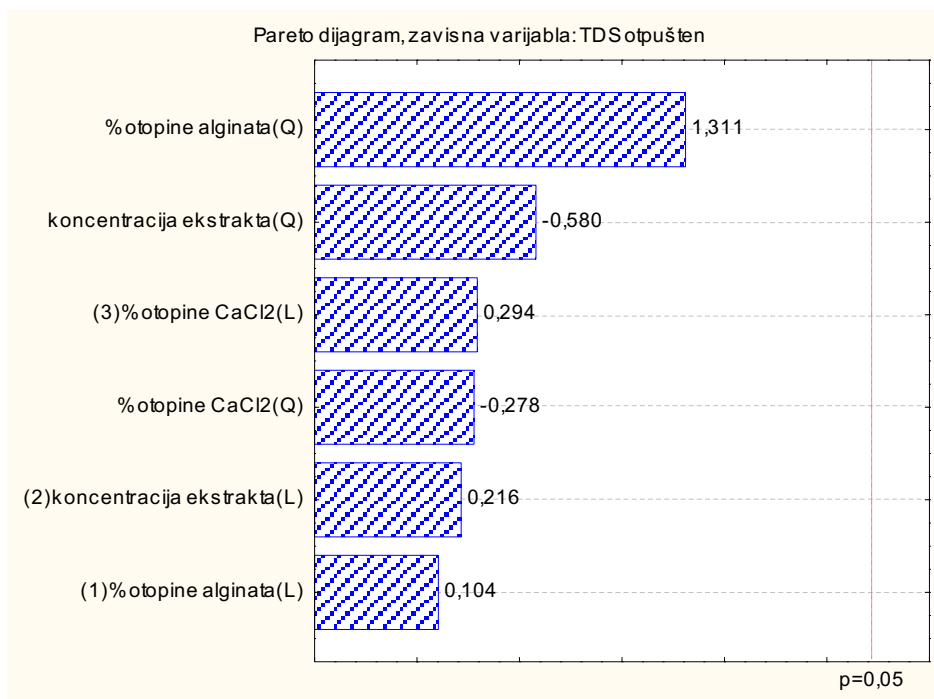
U programskom sustavu Statistica izrađeni su Pareto dijagrami za svako pojedino svojstvo.



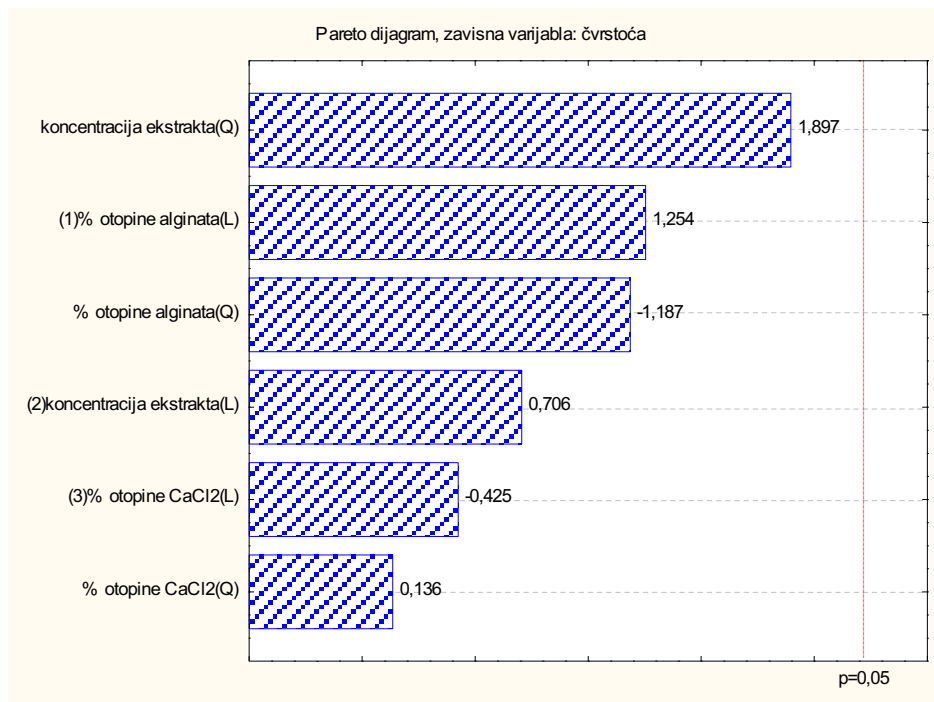
Slika 8. Pareto dijagram za veličinu čestica



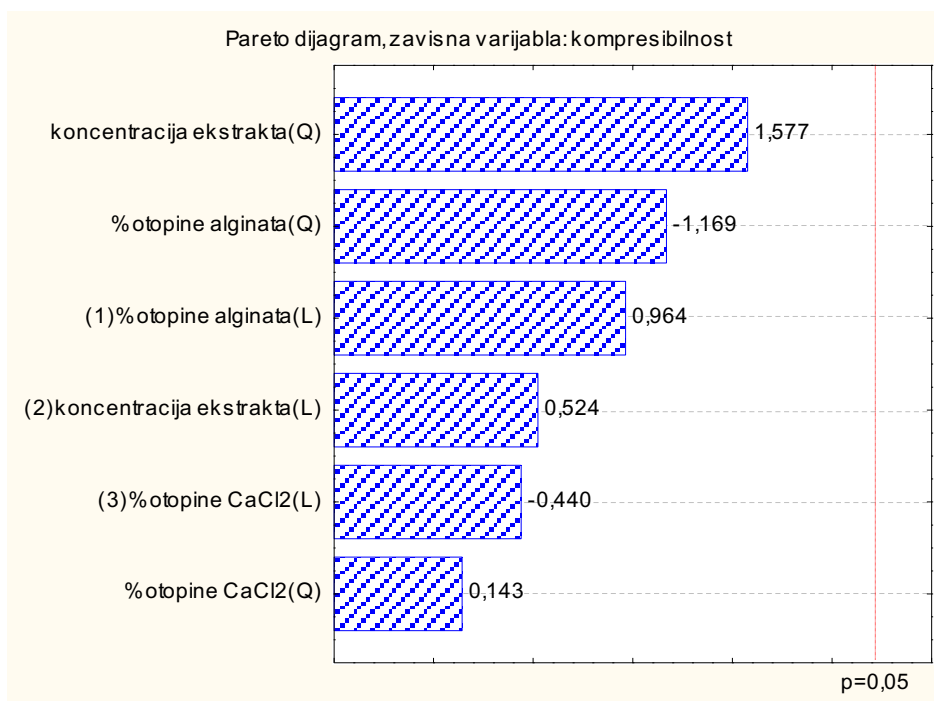
Slika 9. Pareto dijagrami za vodljivost nakon 60 min



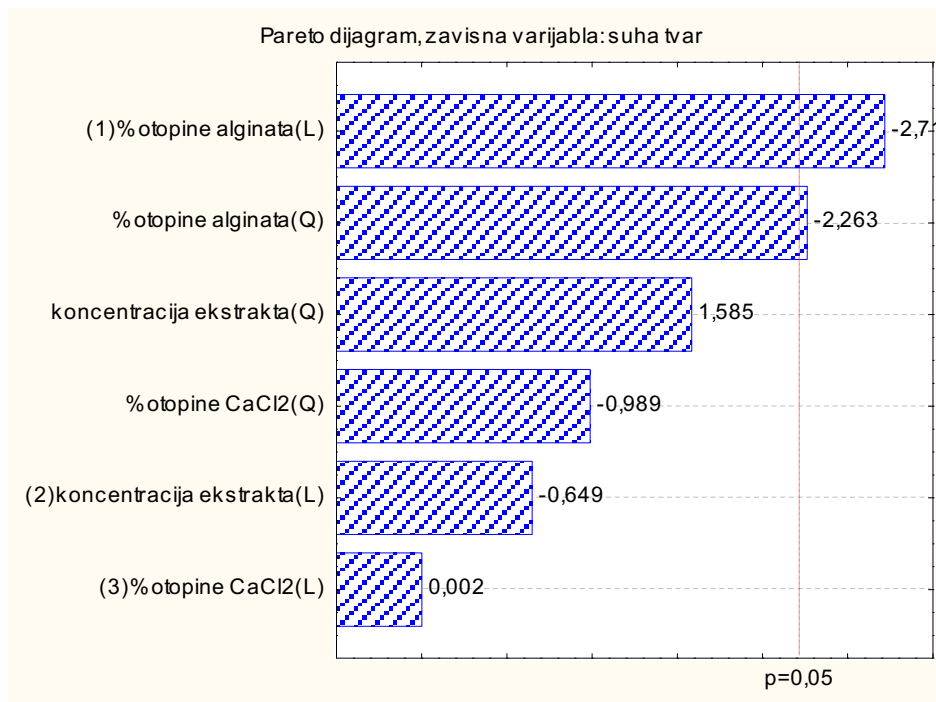
Slika 10. Pareto dijagram za TDS nakon 60 min



Slika 11. Pareto dijagram za čvrstoću

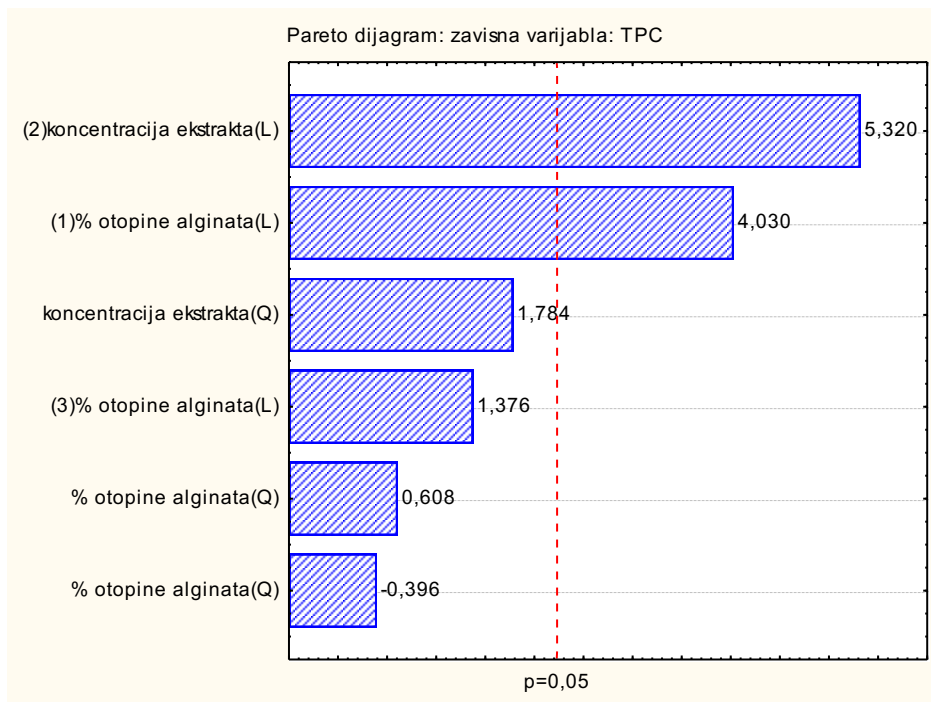


Slika 12. Pareto dijagram za kompresibilnost

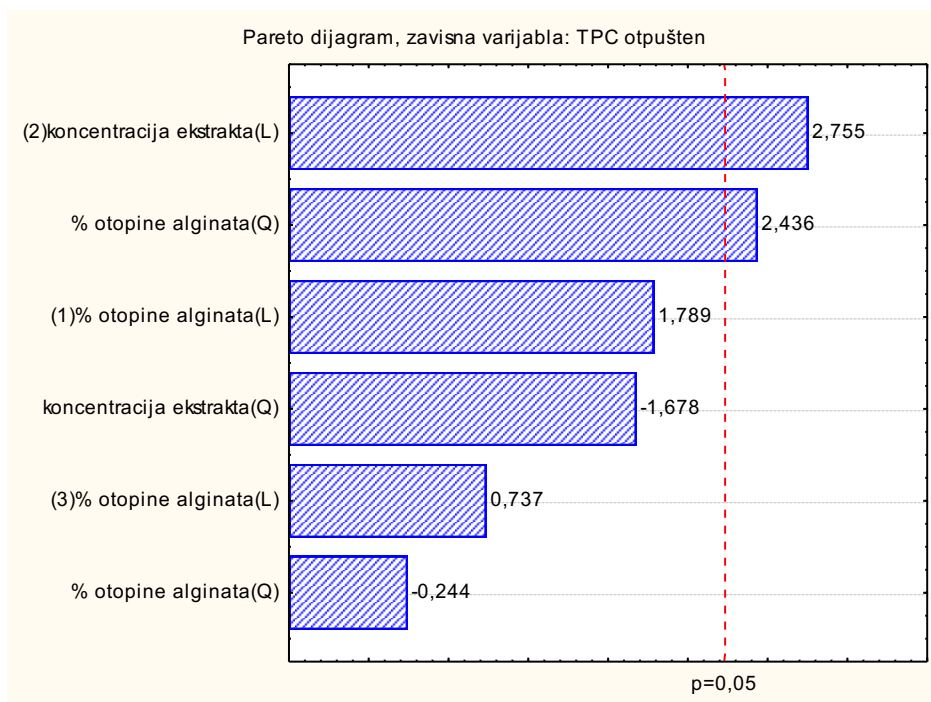


Slika 13. Pareto dijagram za suhu tvar

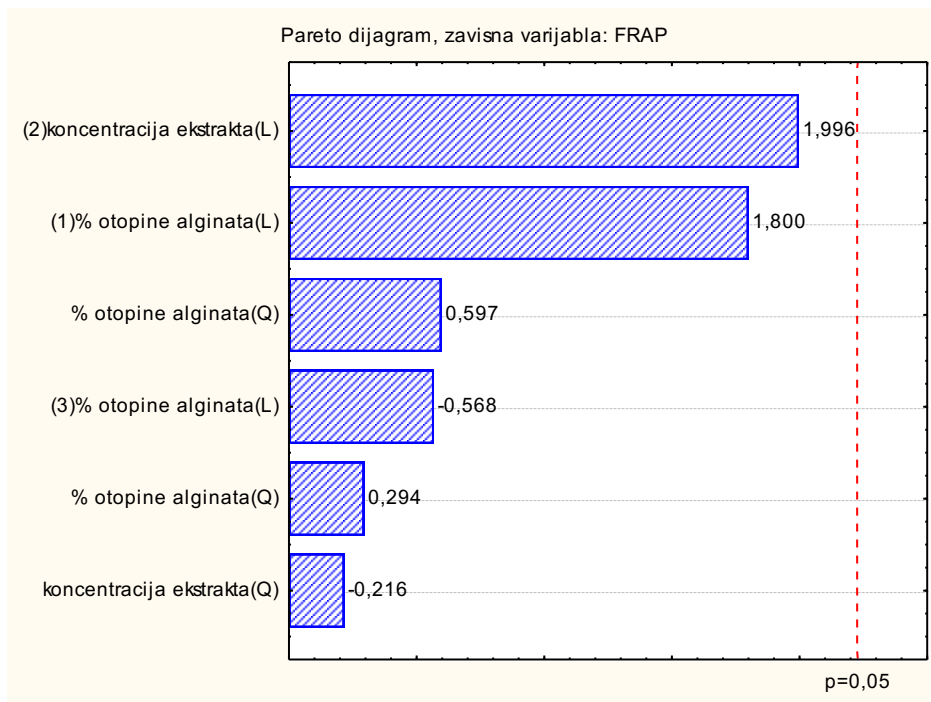
Na slikama 8, 9, 10, 11, 12 i 13 nalaze se Pareto dijagrami za svako pojedino fizikalno svojstvo: veličinu čestica, vodljivost i TDS nakon 60 minuta, čvrstoću, rad kompresije i suhu tvar. Kod Pareto dijagrama za veličinu čestica vidljiva su dva značajna faktora koja utječu na samu veličinu čestica mikrokapsula a to su koncentracija otopine alginata i koncentracija ekstrakta. Oboje utječu na veličinu čestica sličnim intenzitetom. Koncentracija alginata je proporcionalna veličini čestica i porastom koncentracije alginata raste veličina čestica. S druge strane, porastom koncentracije ekstrakta veličina čestica opada. Kod Pareto dijagrama za vodljivost i TDS niti jedan od parametara ne utječe značajno na svojstva. Isto vrijedi i za svojstva teksture mikrokapsula. Na čvrstoću i kompresibilnost mikrokapsula niti jedan parametar ne utječe značajno. Na suhu tvar najviše utječe koncentracija otopine alginata. Porastom koncentracije alginata opada suha tvar mikrokapsula. Neki od dobivenih rezultata za čvrstoću i suhu tvar nisu u skladu sa literaturnim podacima prema kojima sa porastom koncentracije alginata raste i suha tvar i čvrstoća mikrokapsula (Belščak Cvitanović, 2017). Ovdje je bitno napomenuti da je eksperiment dizajniran tako da se može procijeniti utjecaj tri parametra na jedno svojstvo istovremeno, dok je u navedenoj literaturi taj utjecaj promatran pojedinačno. Iz ovih je rezultata vidljivo da se utjecaji pojedinih parametara međusobno isprepliću i da se time ne mogu promatrati kao zasebni faktori, te stoga utječu na konačne rezultate procjene utjecaja na proces mikroinkapsulacije.



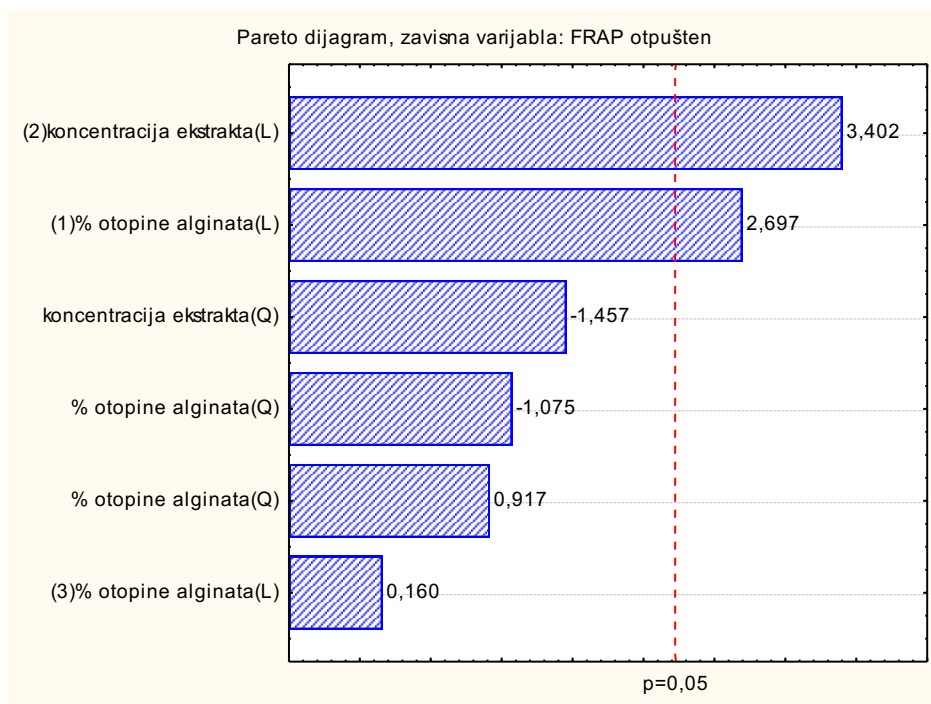
Slika 14. Pareto dijagram za udio polifenola (TPC)



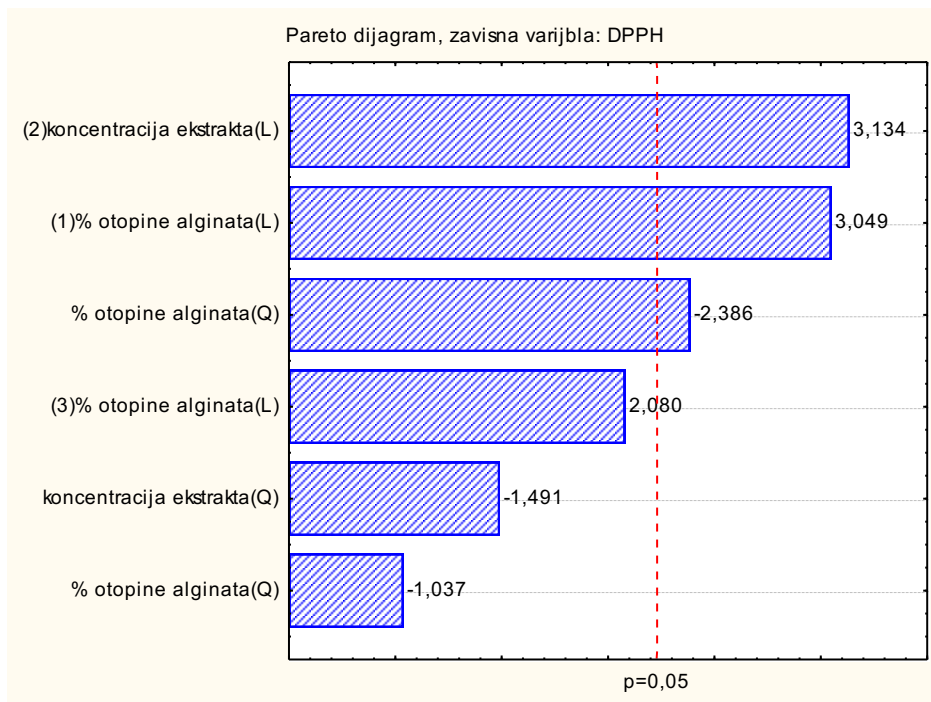
Slika 15. Pareto dijagram za oslobođeni udio polifenola (oslobođeni TPC)



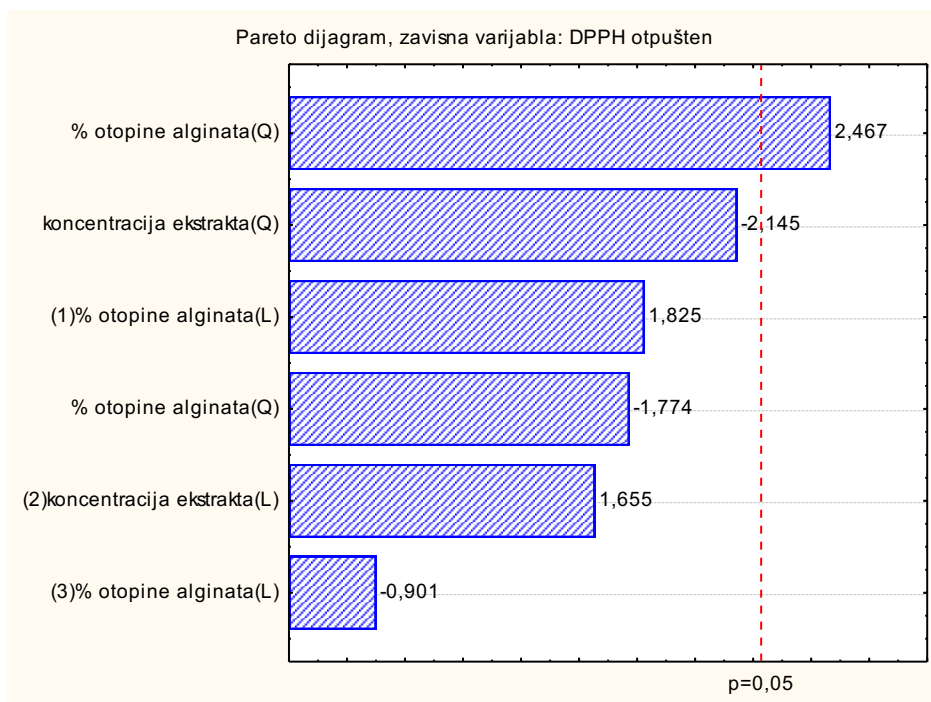
Slika 16. Pareto dijagram za antioksidacijski kapacitet (FRAP)



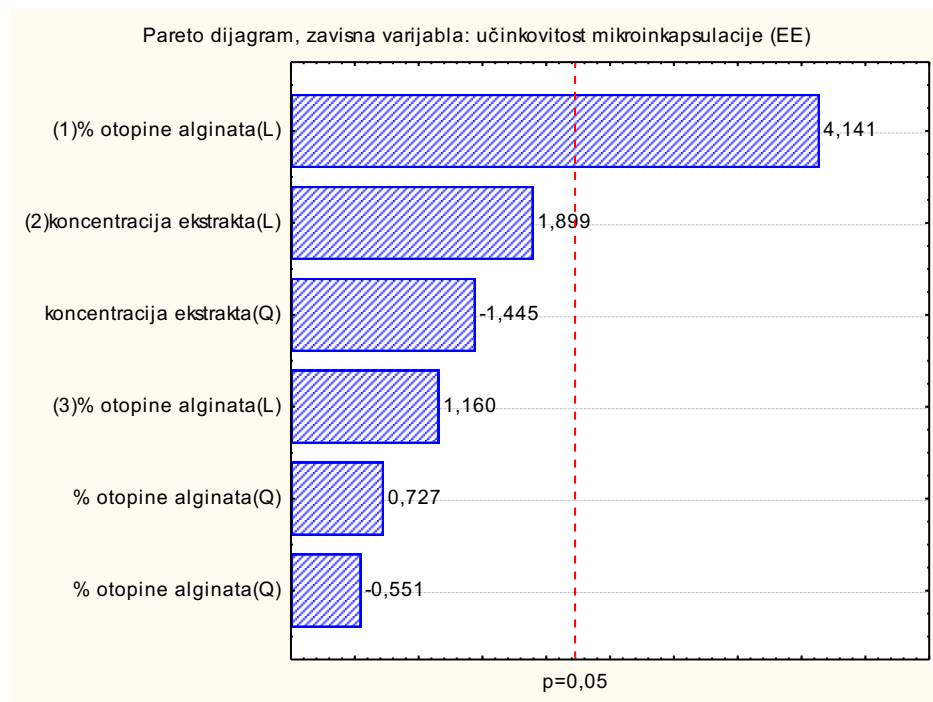
Slika 17. Pareto dijagram za oslobođeni antioksidacijski kapacitet (oslobođeni FRAP)



Slika 18. Pareto dijagram za antioksidacijski kapacitet (DPPH)



Slika 19. Pareto dijagram za oslobođeni antioksidacijski kapacitet (oslobođeni DPPH)



Slika 20. Pareto dijagram za učinkovitost mikroinkapsulacije (EE)

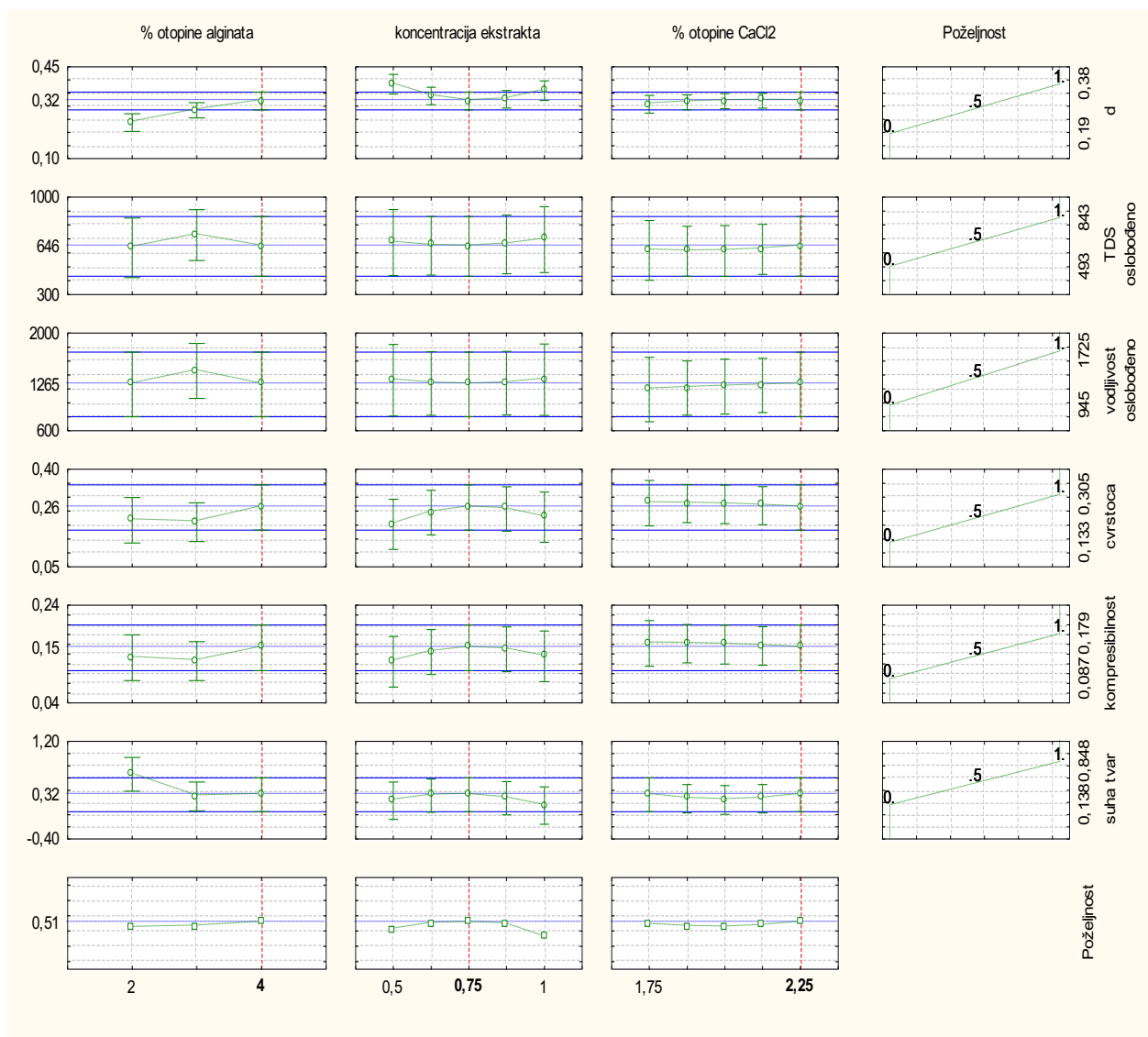
Na slikama 14, 15, 16, 17, 18, 19 i 20 nalaze se Pareto dijagrami za svako pojedino kemijsko svojstvo: antioksidacijsku aktivnost (određenu pomoću DPPH i FRAP metode), udio ukupnih polifenola (TPC metoda), učinkovitost mikroinkapsuliranja te oslobođenu antioksidacijsku aktivnost i oslobođen sadržaj ukupnih polifenola u mikrokapsulama. Iz Pareto dijagrama za TPC vidi se da najveći utjecaj na sadržaj ukupnih polifenola ima koncentracija ekstrakta. Povećanjem koncentracije ekstrakta raste sadržaj ukupnih polifenola u mikrokapsulama. Koncentracija otopine alginata također ima utjecaja na polifenole no ne tolikim intenzitetom kao koncentracija ekstrakta. Koncentracija otopine alginata proporcionalna je sadržaju ukupnih polifenola; njenim porastom raste sadržaj polifenola. Koncentracija otopine alginata i koncentracija ekstrakta također predstavljaju značajne faktore koji utječu na oslobođeni sadržaj ukupnih polifenola i također su proporcionalni sadržaju ukupnih polifenola. Kod Pareto dijagrama za antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom vidljivo je da na nju ne utječe značajnije niti jedan od tri faktora što nije slučaj kod oslobođene antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom kod koje najviše utjecaja ima koncentracija ekstrakta te njenim porastom raste i oslobođena antioksidacijska aktivnost. Osim koncentracije ekstrakta, nešto manji utjecaj ima i koncentracija otopine alginata čijim porastom također raste oslobođena antioksidacijska aktivnost. Na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom najviše utjecaja ima koncentracija ekstrakta čijim povećanjem raste i sama antioksidacijska aktivnost.. Gotovo isti intenzitet utjecaja ima i koncentracija otopine alginata

čijim porastom također raste antioksidacijska aktivnost. Na oslobođenu antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH jedini utjecaj predstavlja koncentracija otopine alginata. Njenim porastom dolazi do rasta aktivnosti antioksidacije. Iz Pareto dijagrama za učinkovitost mikroinkapsulacije može se iščitati da je najznačajniji faktor koji utječe na učinkovitost koncentracija otopine alginata čijim porastom raste i učinkovitost mikroinkapsulacije.

4.6. OPTIMIRANJE UVJETA PROCESA

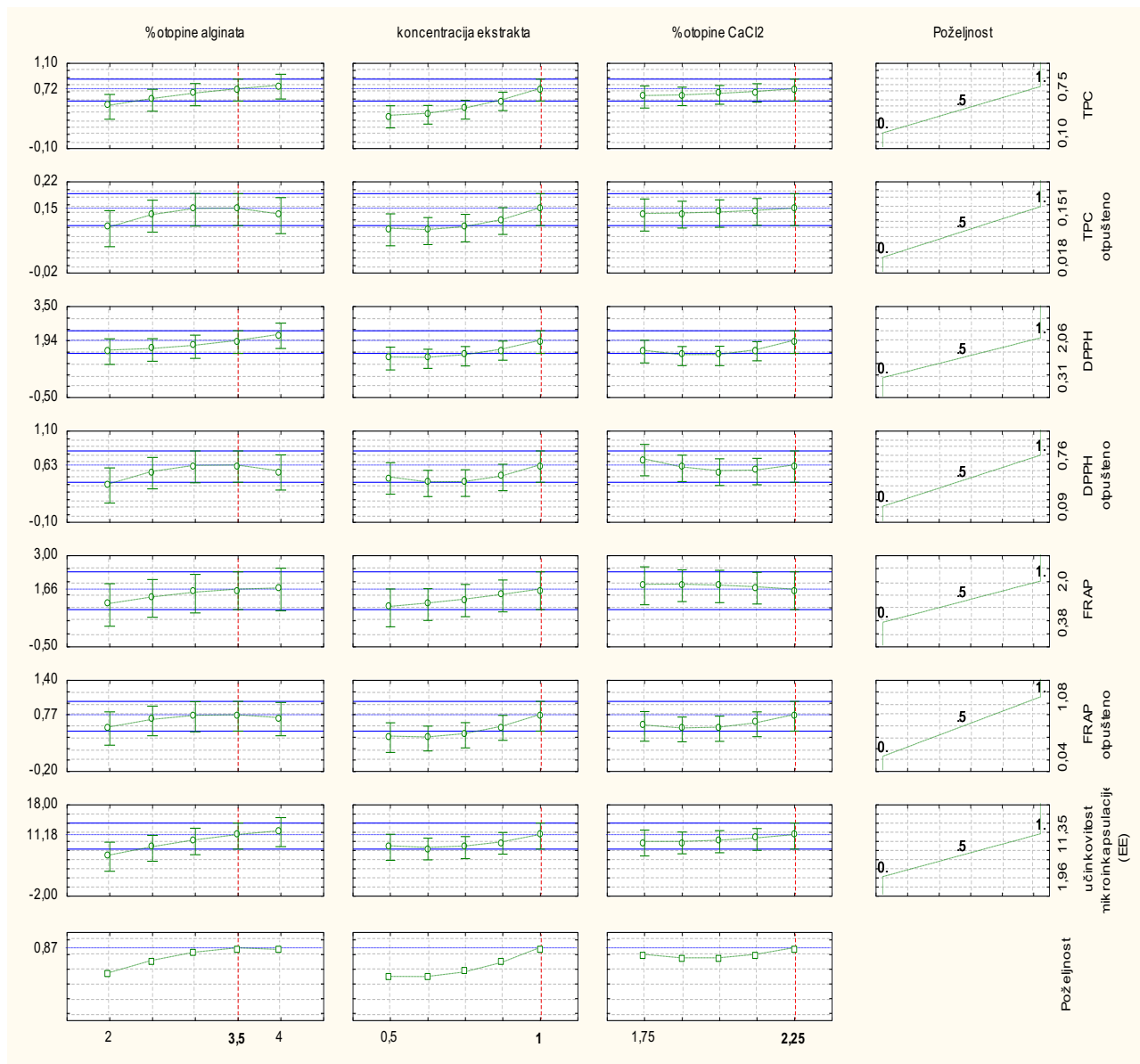
Kako bi se odredili optimalni uvjeti procesa mikroinkapsulacije, u programskom sustavu Statistica izrađeni su profili poželjnosti. Odnos između predviđenih odgovora na jednu ili više ovisnih varijabli i poželjnosti odgovora naziva se funkcijom poželjnosti. Profiliranje poželjnosti odgovora uključuje, prvo, navođenje funkcije poželjnosti za svaku ovisnu varijablu, dodjeljivanjem predviđenih vrijednosti ocjena u rasponu od 0 (vrlo nepoželjno) do 1 (vrlo poželjno). Pojedinačne ocjene poželjnosti za predviđene vrijednosti za svaku ovisnu varijablu tada se kombiniraju računanjem njihove geometrijske srednje vrijednosti. Profili poželjnosti sastoje se od niza grafova, po jedan za svaku neovisnu varijablu, ukupnih rezultata poželjnosti na različitim razinama jedne nezavisne varijable, a razine ostalih nezavisnih varijabli drže konstantnim u navedenim vrijednostima. Uvid u profile poželjnosti može pokazati koje razine prediktorskih varijabli daju najpoželjnije predviđene odgovore na ovisne varijable.

Rezultati su podijeljeni u dvije zasebne grupe od kojih jedna uključuje fizikalna svojstva a druga kemijska svojstva.



Slika 21. Rezultati optimiranja procesa za fizikalna svojstva mikroapsula (veličina čestica, oslobođeni TDS i vodljivost, čvrstoća, rad kompresije, suha tvar)

Temeljem dobivenih rezultata provedenog optimiranja procesa za fizikalna svojstva prema kojima su prikazani optimalni uvjeti procesa mikroinkapsulacije s obzirom na veličinu čestica, oslobođenu TDS i vodljivost, čvrstoću, rad kompresije te suhu tvar, može se vidjeti da predviđeni optimalni uvjeti za postotak otopine alginata iznose 4 %, za koncentraciju ekstrakta 75 % te za postotak otopine CaCl_2 iznose 2,25 %.



Slika 22. Rezultati optimiranja procesa za kemijska svojstva mikroapsula (EE predstavlja učinkovitost mikroinkapsulacije, TPC sadržaj ukupnih polifenola, uz koji je prikazan i oslobođeni TPC, DPPH i FRAP predstavljaju antioksidacijsku aktivnost, uz koje su prikazani također i oslobođeni DPPH i FRAP)

Optimiranje uvjeta procesa zajednički je provedeno i za kemijska svojstva čime su se utvrdili optimalni uvjeti s obzirom na antioksidacijsku aktivnost (određenu pomoću DPPH i FRAP metode), udio ukupnih polifenola, učinkovitost mikroinkapsuliranja te oslobođenu antioksidacijsku aktivnost i oslobođen sadržaj ukupnih polifenola u mikroapsulama. Optimalni postotak udjela alginata s obzirom na kemijska svojstva iznosi 3 %, koncentracija ekstrakta 75 % a postotak otopine CaCl_2 iznosi 2 %. To se poklapa s rezultatima rada kojeg su objavili Zeng i suradnici (2018) gdje su na temelju rezultata dobivenih prilikom istraživanja

mikrokapsuliranog ekstrakta Saskatoon bobica došli su do zaključka da optimalna koncentracija prihvatne otopine u kojoj se formiraju mikrokapsule odnosno CaCl_2 iznosi 2 %. Dobiveni rezultati predstavljaju bitna saznanja o tome kako provesti proces mikroinkapsulacije industrijske konoplje kako bi se dobila optimalna fizikalna i kemijska svojstva. Naime, vidljivo je iz rezultata da za optimalna fizikalna i kemijska svojstva nisu dobiveni isti optimalni procesni uvjeti, što uvelike govori o složenosti procesa mikroinkapsulacije te je time je još više naglašena važnost optimiranja procesnih uvjeta za postizanje najboljih rezultata mikroinkapsulacije.

5. ZAKLJUČCI

1. Koncentracija otopine alginata imala je značajan utjecaj na veličinu mikrokapsula, sadržaj suhe tvari, sadržaj ukupnih polifenola, antioksidacijsku aktivnost, oslobađanje aktivnih tvari i učinkovitost mikroinkapsulacije
2. Koncentracija ekstrakta imala je značajan utjecaj na veličinu čestica, sadržaj ukupnih polifenola, antioksidacijsku aktivnost, oslobađanje aktivnih tvari.
3. Koncentracija prihvatne otopine CaCl_2 nije imala značajan utjecaj niti na jedno od ispitivanih svojstava.
4. Uvjeti procesa pri kojima se dobivaju mikrokapsule optimalnih fizikalnih svojstava (veličine čestica, suhe tvari, TDS-a i vodljivosti) su: postotak otopine alginata od 4 % (w/w), koncentracija ekstrakta 75 % (v/v) te postotak otopine CaCl_2 2,25 % (w/w).
5. Uvjeti procesa pri kojima se dobivaju mikrokapsule optimalnih kemijskih svojstava (sadržaja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodama) su: otopina alginata koncentracije 3 % (w/w), koncentracija ekstrakta 75 % (v/v) i postotak otopine CaCl_2 2 % (w/w).
6. Složenost procesa mikroinkapsulacije i važnost optimiranja procesnih uvjeta vidljiva je u činjenici da je za optimalno provedeni proces mikroinkapsulacije potrebno primijeniti različite procesne uvjete s obzirom na kemijske i fizikalne osobine pripremljenih mikrokapsula.

6. LITARATURA

Ali, E. M., Almagboul, A. Z., Khogali, S. M., Gergeir, U. M. (2012) Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa* L. *Chin. Med.* **3**, 61-64.

Andre, C. M., Hausman, J. F., Guerriero, G. (2016) *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Front. Plant. Sci.* **7**, str. 19.

Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith E, Rahman, M. M. (2008) Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure– activity study. *J. Nat. Prod.* **71**(8), 1427-1430.

Balassa, L. L., Fanger, G. O., Wurzburg, O. B. (1971) Microencapsulation in the food industry. *Crit. Rev. Food Sci.* **2**(2), 245-265.

Baş, D., Boyacı, I. H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* **78**(3), 836-845.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, I. J., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**(4), 1094-1101.

Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Barišić, L., Vrsaljko, D., Karlović, S., Špoljarić, I., Vojvodić A., Mršić, G., Komes, D. (2016) Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food hydrocolloid.* **57**, 139-152.

Belščak-Cvitanović, A., Jurić, S., Đorđević, V., Barišić, L., Komes, D., Ježek, D., Bugarsko, B., Nedović, V. (2017) Chemometric evaluation of binary mixtures of alginate and polysaccharide biopolymers as carriers for microencapsulation of green tea polyphenols. *Int. J. Food Prop.* **20**(9), 1971-1986.

- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. **76** (5), 965-977.
- Bodmeier, R., McGinity, J. W. (1988) Solvent selection in the preparation of poly (DL-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *Int. J. Pharm.* **43**(1-2), 179-186.
- Božić-Ostojić, Lj., Antunović, S., Vujčić, B., Martić, M. (2015) Industrijska konoplja – biljka prošlosti i budućnosti. 8th International scientific/professional conference „Agriculture in nature and environment protection, Vukovar, Hrvatska, str. 133-137.
- Byun, Y., Kim, Y. T., Desai, K. G. H., Park, H. J. (2010) Microencapsulation techniques for food flavour. U: *The chemistry and biology of volatiles* (Herrmann, A., ured.), John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, Ujedinjeno kraljevstvo, str. 307-332.
- Desai, K. G. H., Jin Park, H. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry. Technol.* **23**(7), 1361-1394.
- ElSohly, M. A. (2007) *Marijuana and the Cannabinoids*, 1.izd., Humana Press, Totowa, New Jersey
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., Alves, A. (2013) Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications–A review. *Trends Food Sci. Tech.* **31**(2), 138-155.
- Ferrándiz, M., Capablanca, L., Garcia-Sanoguera, D., Bonet-Aracil, M. (2017) Application of antimicrobial microcapsules on agrotextiles. *J. Agric. Chem. Envir.* **6**(1), 62-82.
- Gadžo, D., Đikić, M., Mijić, A. (2011) *Industrijsko bilje*. Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno–prehrambeni fakultet
- Grotenhermen, F., Karus, M. (1998) Industrial hemp is not marijuana: Comments on the drug potential of fiber *Cannabis*. *J. Int. Hemp Assoc.* **5**, str. 96-101.

Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J., Stephens, G. J. (2012) Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol. Therapeut.* **133**(1), 79-97.

Hrvatska agencija za hranu (2015) Znanstveno mišljenje o utjecaju na zdravlje različitih vrsta hrane od sjemenki i koja sadrži sjemenke industrijske konoplje, <https://www.hah.hr/pregled-upisnika/?preuzmi_misljenje=44> . Pristupljeno 29. kolovoza 2019.

Karača, S. (2016) Utjecaj različitih sustava nosača na inkapsulacijsku učinkovitost polifenolnih spojeva lista maslačka (*Taraxacum officinale* L.). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Kim, Y. D., Morr, C. V. (1996) Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. *J. Agr. Food Chem.* **44**(5), 1314-1320.

Kiyama, K. (1998) Applications of Polyvinyl Alcohol Microcapsules. U: Novel Cosmetic Delivery Systems (Magdassi, S., Touitou, E. ured.), CRC Press, str. 315.

Kogan, N. M., Mechoulam, R. (2007) Cannabinoids in health and disease. *Dialog. Clinic. Neurosci.* **9**(4), str. 413.

Kukina, L. (2019) Primjena kemometrije u karakterizaciji in vitro procesa probave te fizikalnih i kemijskih svojstava multivitaminskih dodataka prehrani. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Lee, K. Y., Mooney, D. J. (2012) Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **37**(1), 106-126.

Li, X., Deng, X., Yuan, M., Xiong, C., Huang, Z., Zhang, Y., Jia, W. (1999) Investigation on process parameters involved in preparation of poly-DL-lactide-poly (ethylene glycol) microspheres containing *Leptospira Interrogans* antigens. *Int. J. Pharm.* **178**(2), 245-255.

Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.* **93** (1), 47-56.

- Mehta, R. C., Jeyanthi, R., Calls, S., Thanoo, B. C., Burton, K. W., DeLuca, P. P. (1994) Biodegradable microspheres as depot system for parenteral delivery of peptide drugs. *J. Control. Release.* **29**(3), 375-384.
- Mehta, R. C., Thanoo, B. C., Deluca, P. P. (1996) Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly (d, l-lactide-co-glycolide). *J. Control. Release.* **41**(3), 249-257.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceut.* **3**(4), 793-829.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotech.* **23**(2), 182-186.
- Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Proc. Food Sci.* **1**, 1806-1815.
- Novak, J., Zitterl-Eglseer, K., Deans, S. G., Franz, C. M. (2001) Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. *Flavour Frag. J.* **16**(4), 259-262.
- Obidike, I. C. i Emeje, M. O. (2011) Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of *Entada africana* leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* **137** (1), 553-561.
- Ohtsubo, T., Tsuda, S., Tsuji, K. (1991) A study of the physical strength of fenitrothion microcapsules. *Polymer.* **32**(13), 2395-2399.
- Park, S. J., Shin, Y. S., Lee, J. R. (2001) Preparation and characterization of microcapsules containing lemon oil. *J. Colloid Interf. Sci.* **241**(2), 502-508.
- Poshadri, A., Aparna, K. (2010) Microencapsulation technology: a review. *J. Res. Angraui.* **38**(1), 86-102.

Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewińska, D., Manojlović, V., Massart, B., Nastruzzi, C., Nedović, V., Poncelet D., Siebenhaar, S., Tobler L., Tosi, A., Vikartovská, A. (2008) Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem. Pap.* **62**(4), 364-374.

Rafati, H., Coombes, A. G. A., Adler, J., Holland, J., Davis, S. S. (1997) Protein-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *J. Control. Release.* **43**(1), 89-102.

Sah, H. (1997) Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres. *J. Control. Release.* **47**(3), 233-245.

Schuldt, U., Hunkeler, D. (2000) Characterization methods for microcapsules. *Minerva Biotechnol.* **12**(4), str. 249.

Shah, P., Mashru, R., Rane, Y., Badhan, A. (2008) Design and optimization of artemether microparticles for bitter taste masking. *Acta Pharmaceut.* **58**(4), 379-392.

Silva, P. T. D., Fries, L. L. M., Menezes, C. R. D., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., Bastos J. D.O., Silva, C. D. B. D. (2014) Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciênc. Rural.* **44**(7), 1304-1311.

Small, E., Cronquist, A. (1976) A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon.* **25**(4), 405-435.

Smrdel, P., Bogataj, M., Mrhar, A. (2008) The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. *Sci. Pharm.* **76**(1), 77-90.

Staginnus, C., Zörntlein, S., de Meijer, E. (2014) A PCR marker Linked to a THCA synthase Polymorphism is a Reliable Tool to Discriminate Potentially THC-Rich Plants of *Cannabis sativa* L. *J. Forensic Sci.* **59**(4), 919-926.

Statistica Help (2017) Special Topics-Profilng Predicted Responses and Response Desirability <<https://documentation.statsoft.com/STATISTICAHelp.aspx?path=Experimental/Doe/SpecialTopics/SpecialTopicsProfilingPredictedResponsesandResponseDesirability>> Pristupljeno 6.rujna 2019.

Stojanović, R., Belščak-Cvitanović, A., Manojlović, V., Komes, D., Nedović, V., Bugarski, B. (2012) Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *J. Sci. Food Agr.* **92**(3), 685-696.

Šain, A. (2019) Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Thies, C. (2004) Microencapsulation: what it is and purpose. *Microencap. Food Ingrid.* Leatherhead Publishing, Leatherhead, UK, str. 1-30.

Thomas, B. F. i Elsohly, M. (2015) The botany of *Cannabis sativa* L. U: The analytical chemistry of *Cannabis*: Quality assessment, assurance, and regulation of medicinal marijuana and cannabinoid preparations (Thomas, B.F. ured.), Elsevier, London, str. 1-13.

Tomašić Paić, A. (2012) Svojstva kanabinoidnih receptora ljekovite biljke *Cannabis sativa*. *Med. vjesn.* **44**(1-4), 147-162.

Turner, C. E., Elsohly, M. A., Boeren, E. G. (1980) Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *J. Nat. Prod.* **43**(2), 169-234.

Vemmer, M., Patel, A. V. (2013) Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biol. Control.* **67**(3), 380-389.

Wissam, Z., Ali, A., Rama, H. (2016) Optimization of extraction conditions for the recovery of phenolic compounds and antioxidants from Syrian olive leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **5**, 390-394.

Yang, C. H., Yen, C. C., Jheng, J. J., Wang, C. Y., Chen, S. S., Huang, P. Y., Huang, K. C., Shaw, J. F. (2014) Immobilization of *Brassica oleracea* chlorophyllase 1 (BoCLH1) and *Candida rugosa* lipase (CRL) in magnetic alginate beads: An enzymatic evaluation in the corresponding proteins. *Molecules*. **19**(8), 11800-11815.

Yang, D., Wang, N., Yan, X., Shi, J., Zhang, M., Wang, Z., Yuan, H. (2014) Microencapsulation of seed-coating tebuconazole and its effects on physiology and biochemistry of maize seedlings. *Colloid. Surface. B*. **114**, 241-246.

Yeo, Y., Park, K. (2004) Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch. Pharm. Res.* **27**(1), str. 1.

Yim, Z. H., Tiong, C. B., Mansa, R. F., Ravindra, P., Chan, E. S. (2010) Release kinetics of encapsulated herbal antioxidants during gelation process. *J. Appl. Sci.* **10**(21), 2668-2672.

Yoo, S. H., Song, Y. B., Chang, P. S., Lee, H. G. (2006) Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **38** (1), 25-30.

Yusop, F. H. M., Manaf, S. F., Hamzah, F. (2017) Preservation of Bioactive Compound via Microencapsulation. *Chem. Eng. Res. Bull.* **19**, 50-56.

Zeng, Y. J., Xu, P., Yang, H. R., Zong, M. H., Lou, W. Y. (2018) Purification of anthocyanins from saskatoon berries and their microencapsulation in deep eutectic solvents. *LWT-Food Sci. Technol.* **95**, 316-325.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Ime i prezime studenta